UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

ANNÉE 1963 — N° 213

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Anne-Marie LACOSTE-BASTIÉ

1re THÈSE

Recherches sur le Métabolisme des Acides Organiques non volatils et des Acides Aminés cycliques chez les Bactéries du Rumen

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté

soutenues le Décembre 1963, devant la Commission d'Examen

MM. ASSELINEAU, Président
AGID, Examinateurs
RAYNAUD

IMPRIMERIE PARISIENNE
TOULOUSE
1963

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546522_0068

Anne-Marie LACOSTE-BASTIÉ

PREMIÈRE THÈSE

Recherches sur le Métabolisme des Acides Organiques non Volatils et des Acides Aminés Cycliques chez les Bactéries du Rumen

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

ANNÉE 1963 — N° 213

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Anne-Marie LACOSTE-BASTIÉ

1re THÈSE

Recherches sur le Métabolisme des Acides Organiques non volatils et des Acides Aminés cycliques chez les Bactéries du Rumen

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté

soutenues le Décembre 1963, devant la Commission d'Examen

MM. ASSELINEAU, Président
AGID, Examinateurs
RAYNAUD

IMPRIMERIE PARISIENNE
TOULOUSE
1963

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ DES SCIENCES

PERSONNEL

ADMINISTRATION

MM.	DURAND.	Doyen.
	COMBES.	Assesseur.

HONORARIAT

MM.	CAMICHEL.	Professeur honoraire, Membre de l'Institut.
	CAPDECOMME.	Doyen honoraire.
	CHALAUD.	Professeur honoraire.
	DELTHEIL.	Recteur honoraire, Doyen honoraire.
		Professeur honoraire.
	DUPOUY.	Doyen honoraire, Membre de l'Institut.
		Directeur Général honoraire du C.N.R.S.
	FOUCHÉ.	Professeur honoraire.
	GAUSSEN.	Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut.
	JACQUES.	Professeur honoraire.
	MIGNONAC.	Professeur honoraire.

PROFESSEURS

MM.	VANDEL.	Zoologie, Membre de l'Institut.
	CATHALA.	Chimie Physique et Electrochimie.
	ESCANDE.	Mécanique des Fluides, Membre de l'Institut.
	DUPOUY.	Physique, Membre de l'Institut.
	CASTÉRAS.	Géologie.
	BEDOS.	Chimie.
	CAPDECOMME.	Minéralogie.
	DUPIN.	Radioélectricité.
	TEISSIÉ-SOLIER.	Electrotechnique.
	NOUVEL.	Biologie générale.
	GALLAIS.	Chimie.
	DURAND.	Physique.
	FERT.	Physique.
	DIEHL.	Agronomie.
	COMBES.	Calcul différentiel et intégral.
	LESBRE.	Chimie organique.
	BLAIZOT.	Physiologie.
	BRUNEL.	Physiologie végétale.
	MORQUER.	Cryptogamie.
	HURON.	Mathématiques appliquées.
	MARGULIS.	Pédologie.
	TRICHE.	Chimie analytique et Spertrographie.
	PASQUALINI.	Mathématiques.
	LEDOUX.	Zoologie Appliquée.
	RIVALS.	Agriculture.
	PERRIER.	Physique.
	MATHIS.	Chimie.
	ORLIAC.	Géochimie et Minéralogie.
	LAFOURCADE.	Physique.
	ANGELIER.	Zoologie.
Mlle	DE FERRÉ.	Botanique.
	FARRAN.	Minéralogie et Géotechnique.
	LAUDET.	Physique théorique et Calcul numérique.
	SERFATY.	Biologie animale.
	NOUGARO.	Hydraulique générale et appliquée.
	LAGASSE.	Electrotechnique.
	GARDY.	Génie chimique.
	BLANC.	Physique nucléaire.
	BIREBENT.	Electronique appliquée.
	VOIGT.	Chimie minérale.
	LEREDDE.	Botanique.
	LELUBRE.	Géologie.
	TROCHAIN.	Botanique.
	GOUYON.	Mécanique rationnelle et appliquée.
	BAYET.	Physique.
	MASDUPUY.	Chimie propédeutique.

	LALAGUE.	Mathématiques générales.
	DESSENS.	Physique du Globe.
	BOUIGUE.	Astronomie.
	COUCHET.	Physique.
	LEJEUNE.	Chimie.
	LASCOMBES.	Botanique.
	ASSELINEAU.	Chimie biologique.
	MAURET.	Chimie.
	GUMOWSKI.	Professeur associé.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	LACROIX.	Techniques agricoles.
	HAMANT.	Botanique.
Mme	BRUNEL.	Physiologie végétale.
M.	GAUTIER.	Physique propédeutique.
Mlle	BERDUCOU.	Physiologie végétale.
MM.	LASCOMBES.	Botanique.
	MARONI.	Chimie.
	SECONDAT.	Zootechnie et Hydrobiologie appliquée.
	MIQUEL.	Chimie propédeutique.
	RAYNAUD (Pierre).	Physiologie animale.
	PICCA.	Physique.
	PULOU.	Minéralogie.
	LACOSTE.	Electrotechnique.
	AGID.	Physiologie.

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	BLANCHARD.	Mathématiques.
	MÉRIC.	Mathématiques appliquées.
	COLIN.	Physique.
	BEETSCHEN.	Biologie générale.
	MONTEL.	Chimie.
	COULON.	Physique industrielle.
	REY.	Botanique.
	CRUMEYROLLE.	Mathématiques.
	JOURDHEUIL.	Zoologie.
	BUGAREL.	Génie chimique.
	CAMBOU.	Physique.
	MEDIONI.	Psychophysiologie comparée.
	COULOMB.	Physique.
	MASCART.	Mathématiques.
	POMMIEZ.	Mathématiques générales.
	SÉVELY.	Physique industrielle appliquée.
	THIRRIOT.	Mécanique des Fluides.
M.	DAVID.	Physique.
Mme	LECAL.	Zoologie.
M.	MIROUSE.	Géologie.
Mlle	LAPEYRE.	Mathématiques.
M.	DAT.	Mécanique des Fluides.
MM.	PILOD.	Physique.
	LARROQUE.	Physique.
	BARRANS.	Chimie.
	ZALTA.	Chimie biologique.

CHARGÉS D'ENSEIGNEMENT

MM.	BOURSIN.	Mathématiques.
	CÉA.	Mathématiques M.P.C.
	JEANNIN.	Chimie minérale.
	THÉNOZ.	Minéralogie et Géotechnie.

SECRÉTARIAT

M.	ARGILAS.	Conseiller Administratif des Services Universitaires.

Ce travail, commencé à l'ancien laboratoire de Physiologie de la Faculté des Sciences, a été terminé à l'Institut de Physiologie. Je remercie Monsieur le Professeur Blaizot, alors Directeur de l'Institut de Physiologie, maintenant Recteur de l'Université de Poitiers, de m'avoir accueillie dans son service et de m'avoir offert des possibilités matérielles, permettant un travail plus efficace dans un cadre plus agréable. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Ma formation de pharmacien m'avait déjà donné le goût de la physiologie et de la biochimie. C'est Monsieur le Professeur Raynaud, vétérinaire de formation et alors Attaché de Recherches, qui a su m'intéresser au problème de la digestion des Ruminants et attirer mon attention sur le rumen. Ses conseils assidus et l'amitié qu'il m'a toujours témoignée m'ont permis de développer ces recherches. Je tiens à lui témoigner ici ma très sincère reconnaissance.

C'est à Monsieur le Professeur Terroine que je dois d'avoir mené à bien ce travail. Il m'a aidée de ses conseils bienveillants et m'a poussée à persévérer. Je le prie d'agréer mon respectueux et fidèle attachement.

C'est pour moi un agréable devoir de remercier également Monsieur le Professeur Agid qui, remplaçant Monsieur Blaizot dans la lourde tâche de Directeur de Recherches, s'est intéressé à mon travail et m'a aidée à mettre en forme ce mémoire. Qu'il accepte ma profonde gratitude et mes sentiments déférents.

Je suis très touchée de l'honneur que me fait Monsieur le Professeur Asselineau de présider cette thèse. Je lui dois d'avoir appuyé mon travail. Il m'a conseillée dans un moment important. Qu'il soit assuré de mon admiration et de mes sentiments très reconnaissants.

C'est dans le laboratoire du R.P. Carles, Maître de

Recherches au laboratoire de Physiologie végétale de l'Institut Catholique, que j'ai fait « mes premiers pas » en chromatographie. Je lui exprime mes vifs remerciements pour ses conseils judicieux.

J'adresse mes remerciements très chaleureux à mes camarades de laboratoire qui ont eu une part active dans l'élaboration de ce mémoire.

Enfin, je remercie également tout le personnel de l'Institut qui m'a témoigné un dévouement qui m'a été précieux.

Je ne peux enfin que me féliciter de l'intérêt qu'il y a pour moi d'appartenir à la Commission de « la digestion des Ruminants » du Centre National de la Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation du C.N.R.S. J'ai retiré de ces colloques un double bénéfice, celui de confronter mes propres recherches avec les expériences des autres chercheurs et celui de faire régulièrement le point sur l'état des travaux concernant les Ruminants en France et parfois à l'étranger.

PLAN SOMMAIRE

INTRODUCTION

LES TECHNIQUES UTILISÉES

I. **Le matériel d'étude.**

A. Les animaux.
B. Les prélèvements et les échantillonnages du contenu de rumen.
C. La préparation des suspensions de bactéries du rumen.
D. La méthode d'incubation *in vitro*.

II. **Les méthodes analytiques.**

A. Techniques chromatographiques :

1° *Chromatographie des acides organiques.*

a) Les acides organiques non volatils du contenu du rumen.
b) Les acides organiques aromatiques.
c) Les acides indoliques.
d) Les acides volatils de C_1 à C_6.

2° *Chromatographie des acides aminés.*

B. Techniques biophysiques et biochimiques.

1° *Dosage des acides organiques.*

a) Dosage de l'acidité volatile.
b) Dosage de l'acidité organique totale et de l'acidité organique fixe.

2° *Dosage des composés azotés.*

a) Dosage de l'azote total (Kjeldahl).
b) Dosage de l'azote ammoniacal.
c) Dosage de l'azote aminé.

3° *Etude de la décarboxylation des acides aminés et des acides organiques.*

4° *Dosage de la tryptophanase.*

III. **Techniques bactériologiques.**

A. Cultures sélectives par la méthode d'enrichissement du milieu.
B. Préparation des milieux d'isolement.
C. Isolement et purification d'une espèce.
D. Identification d'une espèce.

PREMIÈRE PARTIE

LES ACIDES ORGANIQUES NON VOLATILS DANS LA PANSE

I. **Existence d'acides non volatils dans la panse.**

A. Mise en évidence d'acides organiques aliphatiques et aromatiques.

B. Dosage des acides organiques non volatils.

C. Variation des acides organiques fixes et totaux dans le rumen. Influence du régime alimentaire et du repas.

II. **Métabolisme des acides non volatils dans la panse.**

A. Les acides de la plante-aliment.

B. Les acides organiques fixes formés a partir des constituants de la plante-aliment.

C. Dégradation des acides organiques fixes en acides volatils.

III. **Conclusion.**

Conséquences physiologiques.

DEUXIÈME PARTIE

LES ACIDES AMINÉS CYCLIQUES DANS LA PANSE

I. **Etude du catabolisme des acides aminés cycliques par les bactéries du rumen.**

A. Les acides aminés aromatiques :
La L-Phénylanine et la L-Tyrosine.

B. Un composé a noyau imidazole :
La L-Histidine.

C. Les composés a noyau pyrrolidine :
La L-Proline.
La L-Hydroxyproline.
L'Acide L-Pyrrolidone-Carboxylique.
La 2-Pyrrolidone.

Etude de la désamination des composés a noyau pyrrolidine

D. Un composé a noyau indol :
Le L-Tryptophane.

Etude de l'activité tryptophanasique
des bactéries du rumen

1° *Conditions d'action de l'enzyme.*
2° *Détermination de l'activité spécifique.*
3° *Etude de l'influence des glucides.*

Etude des échanges gazeux
accompagnant
le catabolisme des acides aminés cycliques

II. **Etude de l'anabolisme des acides aminés cycliques.**

III. **Etude des agents de la dégradation des acides aminés cycliques.**

1° *Influence, sur la croissance des bactéries, des acides acides aminés cycliques fournis individuellement comme seule source d'azote.*
2° *Les espèces qui jouent un rôle dans le catabolisme des acides aminés cycliques.*

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Bibliographie

INTRODUCTION

Le plus vieux texte concernant l'estomac des Ruminants est sûrement celui d'Aristote dans son *Historia Animalium* où il reconnaît que l'estomac des Ruminants diffère de celui des autres animaux par sa structure compartimentée. Le Ruminant est, en effet, un polygastrique : son estomac est composé de quatre réservoirs : le Rumen (ou panse), le Réticulum (ou réseau), l'Omasum (ou feuillet) et l'Abomasum (ou caillette).

Bien que les littératures grecque et romaine abondent en références sur les Ruminants domestiques, les connaissances de leur anatomie et de leurs fonctions digestives datent du XVIII[e] siècle. La panse, qui représente la première cavité digestive, est un organe très volumineux : son volume atteint 80 % du volume stomacal total; sa capacité chez l'adulte varie avec l'âge et la taille de l'animal, mais est de l'ordre de 4 à 10 litres chez le mouton, de 100 à 250 litres chez le bœuf.

La première expérimentation scientifique sur le Rumen est celle de Reaumur en 1752 : il introduit de petits tubes métalliques contenant du foin dans la panse d'un mouton, pensant observer une désintégration, tout comme il avait observé celle de la viande dans l'estomac d'un Monogastrique; mais cette expérience fut sans succès. Stevens, en 1777, et Spallanzani en 1783, reprennent ces expériences en plaçant des herbes hachées dans des tubes perforés et constatent la disparition de ce matériel. Il existerait donc, dans cet estomac, un suc capable de dissoudre les aliments. Ainsi la sécrétion d'un suc digestif dans la panse a été longtemps admise. Pour Spallanzani, le liquide sécrété est simplement du suc gastrique tandis que pour Tiedemann et Gmelin (1826) « ce liquide épais et salé » ne joue aucun rôle dans la dissolution des aliments; il permet seulement leur ramollissement : « l'action que la panse exerce sur les aliments consiste à les ramollir au moyen de la liqueur alcaline que leurs parois sécrètent et qui se mêle à ces substances. »

C'est Bischoff, d'après Colin (1871), qui démontra, le

premier, que l'épithélium de la panse était dépourvu de cellules sécrétrices : il découvrait ainsi le caractère différentiel de l'estomac et du rumen des polygastriques. A partir de ce moment de nombreux travaux suggèrent que la fibre végétale consommée par le Ruminant n'est pas dégradée par un suc digestif; cependant il faut attendre 1884 pour que Tappeiner établisse l'importance de la microflore du rumen comme agent digestif. Plusieurs sortes de microorganismes peuvent convertir la cellulose en acides volatils dont 50 % d'acide acétique. En 1885, Wilsing calculait, à partir d'expériences *in vitro,* que 104 g d'acides volatils étaient produits par la fermentation de 1 kg de foin chez la chèvre. Plus tard, Pringsheim (1912), Woodman et Steward (1928) ont montré que ces acides provenaient de la fermentation bactérienne des glucides.

Le premier examen microscopique des microorganismes du rumen a été fait par Haberlandt en 1918.

Ainsi, de considérables travaux sur la nutrition des Ruminants ont été réalisés au siècle dernier. Les dates que nous avons citées marquent des étapes importantes dans la connaissance des processus de la digestion dans la panse et ouvrent un champ immense d'expérimentation. Cependant, des connaissances détaillées sur les fonctions du rumen et particulièrement sur l'importance nutritionnelle des acides gras volatils ne se sont accumulées que depuis ces cinquante dernières années, période pendant laquelle de rapides progrès dans la physiologie, la biochimie et la bactériologie ont été accomplis.

Les études de Barcroft et de ses collaborateurs, sur le mouton, révèlent qu'une quantité notable d'acides volatils provenant de la fermentation dans le rumen sont absorbés par cet organe [Mc Anally et Phillipson (1942), Barcroft et coll. (1944)]. L'éveil est alors donné sur l'importance nutritionnelle de ces acides. Mais il manquait une méthode valable d'analyse du mélange d'acides volatils. Cette difficulté fut surmontée par Elsden en 1946, qui mit au point la chromatographie des liquides de rumen sur colonne de silice et put ainsi séparer et doser les acides acétique, propionique et butyrique. A partir de ce moment-là les travaux abondent et il serait fastidieux d'énumérer ici les dizaines de publications qui les concernent. Nous citerons seulement les travaux les plus démonstratifs et les plus marquants.

Une seconde étape dans l'analyse de ces acides commence avec la mise au point de la chromatographie de partage gaz-liquide de James et Martin (1952). Cette méthode dévoile

qu'à côté des acides acétique, propionique et butyrique, mélange retrouvé aussi bien dans la panse et le cæcum des Ruminants, que dans le cæcum et le côlon du cheval, du porc, du lapin, du rat, du chien, existent, en petite quantité, les acides valérique, caproïque, et caprique ainsi que des acides à chaîne ramifiée : isobutyrique, méthyl-2 butyrique, isovalérique et isocaproïque [Annison (1954), El-Shazly (1952)], acides caractéristiques du rumen.

L'acide formique existe à l'état de trace dans le rumen de mouton selon Claren (1942), qui a observé des concentrations allant de 0,02 à 0,04 %.

L'influence d'une ration riche en protéines sur la concentration des acides volatils du rumen ne constitue un champ d'expérimentation que depuis 1952 avec El-Shazly, Annison (1954), Davis et coll. (1957). Ces auteurs montrent qu'il y a une augmentation des acides volatils totaux et, en particulier, des acides à chaîne ramifiée. Un exemple est donné par les études *in vitro* d'Annison (1956) : avec des suspensions lavées, incubées en présence de caséine, il obtient : acide acétique 61 %, acide propionique 19 %, acide butyrique 10 %, acide isobutyrique 4 %, acides à chaîne ramifiée 5 %, acide n-valérique 1 %.

Les concentrations des acides volatils et leurs taux respectifs dépendent du régime. Mais, d'une façon générale, l'acide acétique prédomine, puis viennent l'acide propionique et à un degré moindre l'acide butyrique.

La découverte des acides volatils comme produits terminaux du métabolisme bactérien, puis comme source d'énergie pour le Ruminant a attiré l'attention sur le problème de leur dosage. Des essais de dosage de chaque acide volatil après le repas ont été effectués par Gray et Pilgrim en 1951. Mais le problème est complexe car la concentration d'un acide, à un moment donné, dépend :

a) de sa production dans le rumen;
b) de son absorption;
c) de son passage dans l'omasum;
d) de sa dilution par la salive;
e) de son utilisation par les microorganismes;
f) de sa conversion en d'autres métabolites.

Un dosage valable ne peut donc être accompli que par une expérimentation *in vitro* (Carroll et Hungate, 1954), (Halse et Velle, 1956).

Les résultats des analyses *in vivo* ne rendent pas compte, de manière absolument quantitative, de la transformation

des glucides et protides en acides volatils. La quantité d'acides volatils dans le rumen est néanmoins toujours très élevée. Exprimée en acide acétique, Marshall et Phillipson (1945) en trouvent 6,04 à 7,95 g pour 100 g de matière sèche chez le mouton. Elsden et coll. (1946) donnent les valeurs de 9,7 g pour le mouton et 4,8 g pour le bœuf. Par des expériences *in vitro*, Gray, Pilgrim et Weller (1951) estiment que 200 à 250 g d'acide acétique sont produits par kg de paille de blé et 250 à 300 g par kg de foin de luzerne. Si cette fermentation *in vitro* est représentative de la fermentation réelle dans la panse, il se formerait donc de 2 500 à 3 000 g d'acides volatils totaux dans le rumen de la vache consommant 10 kg de foin de luzerne.

Sheppard, Forbes et Johnson (1959), à l'aide d'acétate marqué, montrent qu'à partir d'une ration entièrement constituée par du foin il se forme 0,126 millimole (7,56 g) d'acide acétique par 100 ml de liqueur de panse pendant une période de 7 heures consécutives au repas.

Chez des vaches en lactation le taux moyen de production journalière est de 40 moles (2 400 g) d'acide acétique, 12,8 moles (947 g) d'acide propionique, 15,5 moles (903 g) d'acide butyrique (Hungate, Mah et Simesen, 1961).

Ces résultats partiels rendent compte de l'importance des acides volatils produits en quantité élevée par les bactéries de la panse à partir des différents constituants de la ration alimentaire.

Si les acides volatils, produits terminaux du métabolisme bactérien dans la panse, ont fait l'objet d'un nombre considérable de travaux, par contre, les recherches consacrées aux acides organiques non volatils, produits du métabolisme intermédiaire, sont plutôt rares.

Frappée par l'importance des acides volatils, nous avons recherché, dans la panse, l'existence d'acides fixes. Après avoir mis en évidence une quinzaine d'acides, aliphatiques et aromatiques, nous avons étudié leur origine, leur importance, leur variation avec l'alimentation, leur cycle métabolique.

L'origine protidique de certains de ces acides nous a amenée à l'étude de la dégradation des acides aminés, tout particulièrement des acides aminés cycliques qui, jusqu'alors, ont fait l'objet de très peu de travaux.

Pour ces recherches, nous avons surtout eu recours à l'étude des fermentations *in vitro* par les cultures mixtes. L'expérimentation *in vitro* demande une connaissance

exacte du milieu contenu dans le rumen pour établir des conditions aussi voisines que possible de celles réalisées *in vivo*.

Le liquide de rumen réalise un milieu de culture idéal pour la prolifération des microorganismes : d'abord en maintenant des conditions constantes d'humidité, de température, de pH, d'anaérobiose, de type d'alimentation, ensuite en étant un système ouvert : d'une part, une partie de la microflore se renouvelle en même temps que l'apport de nourriture, d'autre part les produits de déchet du métabolisme bactérien sont éliminés soit par passage dans l'omasum, soit par absorption à travers la paroi du rumen.

Examinons plus en détail les facteurs constants :

1° *L'humidité :* il y a environ 10 % de matières sèches dans le rumen (9,3 % en moyenne chez le bovin d'abattoir) (Bastié, 1957). Le taux d'humidité est donc de 90 % environ. Pearson et Smith (1943) donnent des valeurs un peu plus faibles et différencient le sac dorsal (82,5 %) du sac ventral (83,9 %).

2° *La température :* la température de l'intérieur du rumen est maintenue entre 38 et 41°C. Elle oscille dans des limites extrêmement étroites : 39°C à 40°C, en dehors des variations temporaires entraînées par la consommation de liquide (Mc Anally et Phillipson, 1944).

3° *Le pH :* le pH du contenu de la panse est aux environs de 7, généralement du côté acide de la neutralité. Ce pH varie peu pour un animal donné et un régime donné grâce aux substances tampons qu'apporte continuellement la salive. En effet, chez les Ruminants, les parotides sécrètent d'une façon continue une quantité importante de salive: les 50 litres élaborés en 24 heures par un bœuf renferment 300 grammes de bicarbonate de sodium (Barnett et Reid) et 34,25 g de phosphore (Mc Dougall, 1948). Les valeurs de pH mentionnées par les auteurs s'échelonnent entre 5 et 7,5. Monroe et Perkins (1939), Phillipson (1942), Chance et coll. (1953) ont montré que le pH diminuait après le repas, ceci étant en relation avec la formation d'acides volatils. L'addition de glucides à la ration, tels glucose ou mélasses, occasionne une chute rapide de pH (Elsden et Phillipson, 1948) mais qui est transitoire.

4° *L'anaérobiose :* le rumen est un système anaérobie fortement réducteur. La tension d'oxygène y est toujours faible, car ce gaz sitôt ingéré ou sitôt formé est avidement utilisé par beaucoup de microorganismes. Les conditions anaérobies sont en partie maintenues par les bactéries elles-mêmes grâce aux gaz produits par leur métabolisme propre.

Kleiber et coll. (1943) donnent la composition suivante d'un échantillon typique : 67 % de CO_2, 26 % de méthane, 6 % d'azote, 0,1 % de SH_2 et moins de 1 % d'oxygène. Le liquide du rumen d'un animal sain a un potentiel redox bien défini, aux environs de — 400 mV (Broberg, 1957, 1958). Pour Smith et Hungate (1958), si le potentiel redox est > — 330 mV, la flore méthanogénique ne peut pas croître; pour Hungate (1960), beaucoup d'espèces demandent un potentiel redox < — 420 mV.

D'autre part, Baldwin et Emery (1960) ont confirmé que l'addition de quantités contrôlées d'oxygène à des ingesta du rumen *in vitro* n'avait aucun effet sur le potentiel redox et n'altérait en rien la production de gaz, d'acides volatils, d'ammoniac dans le milieu de fermentation. L'oxygène est donc beaucoup moins nocif pour les bactéries du rumen qu'on ne pourrait le croire. C'est qu'un certain nombre d'espèces sont « euryoxiques », mais ces types sont beaucoup moins abondants que les anaérobies stricts.

5° *Autres facteurs :*

La densité du contenu de rumen varie entre 1,02 et 1,06.

La tension superficielle du liquide de rumen a été récemment étudiée par Nuvole (1961). Sur 25 bovins et sur 25 ovins il obtient respectivement des moyennes de 46,52 ± 2,33 et de 51,23 ± 2,80 dynes/cm^2.

6° *Motilité de l'organe :* les digesta sont sans cesse brassés grâce aux contractions rythmiques du rumen, 5 à 7 par minute (Quin et van der Wath, 1939). Le Bars et coll. (1953) ont signalé que pendant la mastication, les mouvements du rumen augmentaient considérablement.

Le rumen est donc un biotope exceptionnel, c'est pourquoi les microorganismes, et notamment les bactéries, y présentent une densité rarement, sinon jamais observée dans les cultures au laboratoire.

Voici quelques valeurs données par différents auteurs et exprimées en nombre de bactéries par millilitre de liqueur de rumen :

Gall et coll. (1949)	5×10^9 (hiver) 10^{11} (été)
Hungate (1957).	10^7 à 10^9
Bryant et Burkey (1953)	$15 \pm 5{,}1 \times 10^9$ (paille d'avoine) $25 \pm 2{,}5 \times 10^9$ (luzerne et concentré) (1)

(1) Ces chiffres sont donnés par Annison et Lewis.

Moir (1951).....	49×10^7	janvier
	32×10^7	avril
	$40{,}6 \times 10^7$	juillet
	$70{,}9 \times 10^7$	août
	$83{,}7 \times 10^7$	novembre
	$63{,}9 \times 10^7$	décembre (2)

Le nombre total de bactéries varie avec l'alimentation et avec la saison. Les résultats récents de Fauconneau (1961), qui étudie l'influence du repas et du régime alimentaire sur la variation des bactéries libres du rumen, sont significatifs.

Ainsi le foin de graminées associé à l'amidon semblent plus favorables que les autres fourrages pour la multiplication des bactéries : les valeurs suivantes sont exprimées en poids sec par litre de jus de rumen.

Foin de luzerne.....	2,9 g/l
Foin de graminées.....	4,1 g/l
Foin de graminées + orge.....	4,8 g/l
Ray-grass vert.....	3,2 g/l
Choux fourragers.....	4,2 g/l

Ces derniers résultats sont intéressants car ils permettent de concrétiser les chiffres donnés plus haut : si l'on prend comme exemple un bovin dont le rumen a une capacité de 150 litres, sachant qu'il y a en moyenne 4 g de bactéries par litre, le calcul du poids sec total de bactéries nous amène au chiffre énorme de 600 g.

Ainsi la panse, bien que son épithélium du type stratifié kératinisé ne renferme aucune cellule sécrétrice, est un organe digestif véritable, le plus important de tous chez le Ruminant, grâce aux microorganismes qu'elle abrite et qui constituent une véritable symbiose avec l'hôte animal. Ce sont donc les enzymes bactériens, seuls, qui, dans la panse, assurent la digestion de la ration de l'animal, et ceci d'autant plus que la salive du Ruminant, sécrétée en grande abondance (50 l/24 h) chez le bœuf d'après Balch (1958) ne contient pas d'amylase (Nasr, 1950).

Les bactéries prolifèrent aux dépens des glucides et protides de la ration; elles tirent des premiers l'énergie nécessaire à leur croissance, ainsi que les éléments de leurs polysaccharides.

Quel bénéfice l'hôte animal retire-t-il de la présence des microorganismes ? Les produits du catabolisme bactérien sont surtout des acides gras à courte chaîne; ils sont directement absorbés par la paroi du rumen et servent d'aliment

(2) Ces chiffres sont donnés par Barnett et Reid.

énergétique à l'animal. Dans les réservoirs qui font suite au rumen, la symbiose animal-microorganismes cesse au détriment de ces derniers; en effet, ils s'autolysent dans le feuillet, puis subissent une digestion pepsique dans la caillette et servent ainsi d'aliment protéique de choix pour l'animal (digestibilité semblable à celle de la protéine de la levure (85,5). Cette première étape dans la nutrition du Ruminant peut être illustrée par la boutade de HUNGATE (1950) : « Ce sont d'abord les bactéries qui sont nourries et, à leur tour, elles nourrissent l'hôte. »

C'est donc sur cette première étape de la digestion, la plus importante et la plus originale, que nous avons dirigé nos recherches. Le rumen est, en effet, un matériel de choix pour le nutritionniste, le biochimiste et le bactériologiste.

Vu la complexité du milieu présent dans le rumen et les grandes potentialités chimiques des microorganismes, nous avons cherché à mettre en évidence des réactions métaboliques nouvelles relatives aux acides organiques et aux acides aminés cycliques.

Après avoir montré l'origine de certains acides organiques non volatils parmi les catabolites des acides aminés cycliques, nous avons recherché, parmi les microorganismes du rumen, quels en étaient les agents effecteurs; puis nous nous sommes intéressée à la valeur de ces acides aminés en tant que source azotée pour les bactéries.

Le but de notre travail a donc été d'apporter une contribution à l'étude de l'activité de cette véritable usine qu'est le rumen. Car bien que les recherches se soient multipliées ces dernières années, la connaissance des fonctions du rumen n'est pas encore complètement acquise.

LES TECHNIQUES UTILISÉES

Pour faciliter l'exposé des résultats, nous avons groupé dans ce chapitre les techniques que nous avons utilisées au cours de ces recherches. Nous insisterons en particulier sur les méthodes que nous avons modifiées pour les adapter à notre matériel biologique assez spécial.

Nous distinguerons trois parties :

I. Le matériel d'étude.

II. Les méthodes analytiques.

III. Les techniques bactériologiques.

I. LE MATÉRIEL D'ÉTUDE

A. Les animaux

Le matériel du rumen utilisé provient :

— *soit de bovins d'abattoir,*

— *soit de moutons* porteurs de fistules permanentes du rumen (fig. 1) ; la mise en place des canules en chlorure de polyvinyle a été faite selon la technique de Brunaud et Raynaud (1956). Raynaud a bien voulu opérer les animaux lui-même.

Il y a lieu de remarquer que les animaux d'abattoir sont considérés comme étant à jeun depuis 24 heures et les bactéries prélevées dans la panse ne sont pas toujours très actives, surtout en hiver. Par contre, avec les moutons fistulisés, en plus de la facilité des prélèvements *in vivo*, il est possible de contrôler la nourriture et de faire des échantillonnages après les repas, aux heures qui nous paraissent les plus favorables.

B. Les prélèvements et les échantillonnages du contenu de Rumen

Sur les animaux d'abattoir : Aussitôt après l'éviscération, environ 1 kg du contenu du rumen est prélevé de façon aussi homogène que possible, placé dans un bocal hermétiquement clos et transporté rapidement au laboratoire.

Sur les animaux fistulisés : les prélèvements sont faits à l'aide d'un tube de verre dont le diamètre est légèrement inférieur à celui de la pièce interne de la canule et qui est muni d'un piston (simple bouchon de caoutchouc surmonté

Fig. 1

Mouton à fistule permanente du rumen

d'une tige métallique). Par ce système de seringue, le matériel est prélevé à différents niveaux de la poche digestive (fig. 2).

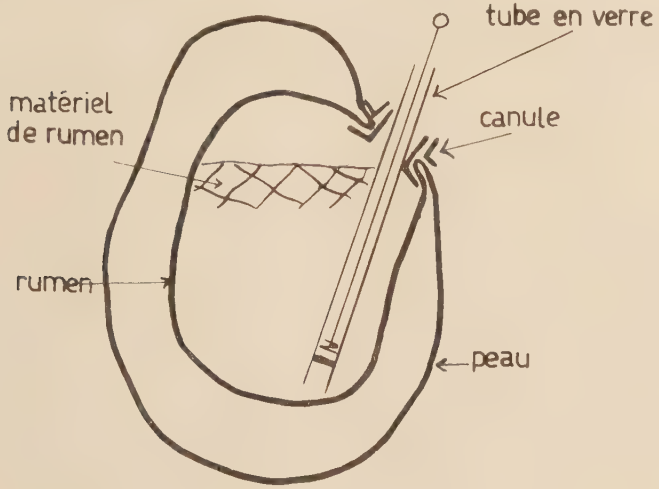


Fig. 2
Coupe transversale du mouton au niveau du rumen
et mode de prélèvement de son contenu

C. La préparation des suspensions de bactéries du rumen

Le contenu du rumen se présente comme un milieu hétérogène semi-liquide (10 % de matière sèche environ). La partie insoluble comprend du matériel végétal à un stade plus ou moins avancé de dégradation, des protozoaires et des bactéries.

Un échantillon frais est filtré à travers un linge fin pour en séparer les grosses particules alimentaires. Le filtrat est centrifugé à 2 000 tours/mn pendant 4 minutes, ce qui le débarrasse des fins débris végétaux et des protozoaires. Le surnageant, qui contient les bactéries en suspension, peut être utilisé pour l'étude des réactions métaboliques, mais si l'on veut connaître les produits terminaux du catabolisme d'une substance pure, il vaut mieux se servir de suspensions lavées de bactéries.

Préparation des suspensions lavées

L'isolement des bactéries peut se faire selon la méthode de centrifugation fractionnée utilisée par Sijpesteijn et Elsden (1952), Doetsch et coll. (1955), Sirotnak et coll. (1953), Lewis (1955).

Nous avons souvent eu recours à la technique suivante qui simplifie les opérations: la liqueur de rumen après passage sur mousseline est centrifugée à 15 000 tours/mn (Servall) pendant 20 minutes. Le culot comprend quatre couches bien distinctes : l'inférieure, brunâtre, et la deuxième vert foncé retiennent débris végétaux et protozoaires; les deux couches supérieures, vert clair et blanchâtre, contiennent les bactéries. Après avoir rejeté le liquide surnageant limpide, on ajoute quelques ml de tampon phosphates et on gratte les deux couches supérieures à l'aide d'un agitateur à bout rond. On verse cette suspension dans un autre tube à centrifuger que l'on remplit de tampon et que l'on centrifuge à 15 000 tours/mn pendant 10 minutes. Les bactéries sont alors lavées une fois. On peut effectuer un second lavage de la même façon. Les bactéries lavées sont alors mises en suspension dans ce même tampon phosphates dont le volume est ramené à la valeur initiale du jus de rumen.

Bien que les auteurs cités précédemment préconisent deux lavages, nous n'avons utilisé, au cours de nos recherches, que des suspensions de bactéries lavées une seule fois, le second lavage affaiblissant les activités enzymatiques.

D. **La méthode d'incubation** *in vitro*

Les bactéries ainsi isolées en suspension dans leur milieu naturel ou en milieu artificiel [tampon phosphates : PO_3H_2K M/15 + PO_4H K_2 M/15 (pH 6,8) + 0,02 % de S Na_2, $9H_2O$] vont servir à mesurer les réactions métaboliques concernant les acides organiques et les acides aminés cycliques.

Les suspensions sont placées dans des Erlenmeyers en présence du substrat à étudier. Le milieu nutritif de certaines fioles est enrichi soit avec 0,4 % de maltose, soit avec du maltose et de l'urée aux taux respectifs de 0,4 % et de 0,02 %. Chaque essai est accompagné de son témoin dans lequel est omis le substrat. L'anaérobiose est réalisée par passage d'un courant gazeux composé de 5 % de CO_2 et 95 % de N_2

On prélève immédiatement une partie aliquote dont on stoppe toute activité métabolique et à partir de laquelle on dose la substance à étudier, soit substrat, soit produit du métabolisme On fait alors incuber l'échantillon restant au bain-marie à 39°C On prélève des parties aliquotes dans une fiole à réaction et une fiole témoin après des temps de 2, 4, 6, 8 et 24 heures d'incubation, afin d'étudier la cinétique de disparition du substrat et de mettre en évidence

les métabolites intermédiaire et terminaux.

Les méthodes d'investigation *in vitro* ont été critiquées par les partisans des méthodes *in vivo*. Doetsch et coll. (1955) en montrent les avantages et les inconvénients; Elsden (1952) en vante les mérites; Hueter (1958) compare la dégradation du glucose, du maltose, de quelques acides aminés et acides organiques dans les deux cas : les résultats concordent qualitativement; les différences quantitatives sont dues, dans la technique *in vitro*,

— à l'accumulation des acides volatils,
— à l'inactivation de certains enzymes,
— à l'exclusion des bactéries qui adhèrent aux fibres végétales.

Il est certain que les deux modes d'expérimentation sont nécessaires et complémentaires. Les expériences *in vitro* permettent d'éliminer un certain nombre de variables inhérentes à l'animal vivant. Elles sont particulièrement précieuses lorsqu'on étudie la physiologie du rumen, surtout en ce qui concerne les réactions métaboliques avec substrats purifiés et les études microbiologiques.

II. LES MÉTHODES ANALYTIQUES

Le liquide de rumen est un milieu biologique très complexe du fait de son hétérogénéité, de sa forte concentration en sels minéraux et en matières organiques non seulement dissous, mais en suspension.

Nous nous sommes proposée l'étude des acides organiques fixes et des acides aminés cycliques. Or, dans un tel milieu, les quantités mises en jeu sont toujours très faibles. Ainsi, en 1952, Mc Donald ne pouvait détecter qualitativement les acides aminés de la liqueur du rumen ni par un test direct à la ninhydrine, ni par chromatographie sur papier d'un filtrat de ce liquide après précipitation des protéines. Les acides organiques fixes, étant donné leur faible concentration par rapport aux acides volatils toujours abondants dans la panse, ont jusqu'à présent échappé aux recherches systématiques. Il faut donc s'adresser à des techniques analytiques très fines pour les isoler, les identifier et les doser. Les méthodes chromatographiques semblaient tout indiquées. C'est pourquoi elles occupent une large part dans ce travail. Nous nous sommes inspirée des premiers travaux de la chromatographie sur papier des acides organiques de l'urine [Osteux et Laturaze (1954, 1955), Nordmann et coll. (1954)]. Mais il a fallu adapter ces méthodes à notre matériel beaucoup plus complexe.

En effet, les résultats sont satisfaisants tant que l'on opère sur des solutions témoins ou sur des milieux biologiques simples; ils sont beaucoup moins bons lorsque la coexistence de nombreux composés minéraux ou organiques complique l'application des méthodes proposées.

La mise au point des techniques de dosage de l'azote ammoniacal et des gaz dégagés par métabolisation des acides fixes et des acides aminés ne nous a pas causé de difficultés particulières.

Nous allons dès lors entreprendre une description détaillée des techniques analytiques utilisées au cours de ce travail.

A. Techniques chromatographiques

La chromatographie de partage sur papier a été largement employée dans ce travail soit pour mettre en évidence les produits intermédiaires ou terminaux du métabolisme dans le liquide de rumen ou dans le milieu artificiel, soit pour suivre l'évolution d'un substrat soumis à l'activité bactérienne, au cours des heures d'incubation.

1° CHROMATOGRAPHIE DES ACIDES ORGANIQUES

a) Les acides organiques non volatils du contenu du rumen

1. *Préparation des échantillons*

Après filtration et centrifugation, le liquide du rumen se trouve séparé des particules solides et, en particulier, des protozoaires et de la majeure partie des bactéries. La liqueur est alors évaporée presque à sec sur un bain-marie à 80°C et avec ventilation. Le pH étant ajusté aux environs de 8 et le milieu étant fortement tamponné, il n'y a pas de perte d'acidité. La légitimité de cette hypothèse est confirmée par le fait que la quantité d'acides volatils dosés directement après distillation concorde exactement avec les résultats de cette nouvelle méthode.

Le résidu sec de chaque échantillon, correspondant à 200 g de jus brut de rumen, est extrait à quatre reprises par 100 ml d'alcool à 80°, à température ordinaire, pendant 15 minutes. Les extraits alcooliques sont réunis et filtrés. L'extraction alcoolique nous a paru préférable à l'extraction aqueuse. En effet, cette dernière exigeait la précipitation préalable des protéines dans le milieu aqueux par l'addition d'un acide jusqu'à pH 2 (technique de Mc Donald), la précipitation par l'alcool à 80° s'étant révélée

lente et insuffisante. D'autre part, cet apport massif d'acide aurait largement saturé les colonnes de résines échangeuses d'anions lors de la purification des extraits à chromatographier.

Une partie du filtrat de l'extrait alcoolique sera soumise aux techniques chromatographiques, l'autre partie servira aux dosages des acides organiques totaux et fixes.

2. *Purification des extraits*

Les extraits sont passés sur des colonnes de résines échangeuses d'ions pour réaliser un dessalage préalable à la chromatographie de partage sur papier. Plusieurs procédés ont été essayés mais se sont révélés peu satisfaisants avec le matériel mis en jeu.

α. Passage de l'extrait alcoolique sur les seules résines cationiques (Dowex 50 dans la forme acide libre - H) pour libérer les acides de leurs sels.

Les résultats sont irréguliers et dus à une purification incomplète. En effet, cette résine n'a pas débarrassé l'effluent des ampholytes ni des substances non ionisées qui perturbent parfois les chromatogrammes. De plus, les résines cationiques présentent l'inconvénient de posséder de légères propriétés adsorbantes vis-à-vis de certains acides. Samuelson (1952), Laturaze (1959) ont insisté sur ce phénomène : l'acide lactique et aussi les acides aromatiques sont fixés.

β. Les extraits insuffisamment purifiés par ce passage sur Dowex 50 exigeaient un passage sur une résine anionique. Ces opérations étaient longues et le passage sur colonnes successives entraînait une perte d'acides.

A la suite de ces insuccès, nous avons utilisé un échangeur anionique seul, selon la technique mise au point par Nordmann et coll. (1954).

Nous avons été ainsi amenée à élaborer la technique suivante :

Les extraits alcooliques de jus de rumen sont passés sur colonne de Dowex 2 dans le cycle formiate : la forme salifiée est préférable à la forme hydroxyle libre pour éviter la dégradation de certains sucres en acides organiques au contact de ces résines, ce qui serait gênant pour l'interprétation des résultats. Ces faits ont été signalés par Phillips et Pollard (1953).

Cette résine fortement basique, très dissociée, a une capacité d'échange indépendante du pH et fixe par conséquent même les acides les plus faibles.

L'alcool ne gêne pas la fixation des ions acides sur la résine et a, de plus, l'avantage de garder en solution et d'entraîner une plus grande partie de matières colorantes que ne le ferait l'eau. En effet, les extraits de contenu de rumen sont fortement colorés par les pigments végétaux qui sont très gênants lors du dépôt de la tache au point de départ du chromatogramme. Il est donc important, après fixation des acides, de laver les colonnes avec de l'alcool dilué jusqu'à ce que celui-ci les ait débarrassées du maximum de pigments et passe incolore. On lave alors la colonne avec de l'eau distillée pour chasser l'alcool. Après rejet de l'effluent, on réalise l'élution des acides fixés sur la colonne par de l'acide formique 6 N; cet acide, très volatil, est facilement éliminé. On règle la vitesse d'écoulement à 1 ml/mn. Les éluats sont alors concentrés au bain-marie à 50°C et en s'aidant d'un courant d'air froid. Les derniers millilitres sont évaporés dans un dessiccateur sous vide; le résidu est repris par un volume connu d'eau distillée avant d'être soumis à la chromatographie sur papier.

3. *Chromatographie de partage sur papier*

On dépose quelques microlitres de la solution des substances à analyser à l'extrémité d'une bande de papier Arches 302. Ce papier nous a donné de meilleurs résultats que le Whatman 1 : les taches sont plus régulières.

Une chromatographie monodimensionnelle dans le solvant acide de Cheftel, Munier et Machebœuf (Propanol/eucalyptol/acide formique/eau 50:50:20 qsp. trouble persistant) nous a donné un chapelet d'acides mal séparés dont les Rf s'échelonnaient entre 0 et 0,90. Une chromatographie à deux dimensions s'imposait donc.

Chromatographie bidimensionnelle.

Papier : Arches 302.

Solvants :

Première dimension :

Solvant alcalin :	alcool à 95° . .	95 volumes
	NH_4OH à 22°B	5 volumes

Deuxième dimension :

Solvant acide :	n-butanol	40 volumes
	acide formique	10 volumes
	eau.	50 volumes

On utilise ce solvant 24 heures seulement après sa préparation, c'est-à-dire après que l'équilibre d'estérification se soit produit.

Développement.

Par voie descendante à la température de 22° ± 1°C dans des cuves en verre.

Après 8 heures dans le solvant alcalin les feuilles sont mises à sécher pendant une nuit. Le lendemain on les soumet au solvant acide durant 8 heures également. On les fait sécher puis on les révèle.

Révélation.

On utilise le révélateur suivant (Linskens, 1955) : glucose 2 g, aniline 2 ml, eau 20 ml, éthanol 20 ml, butanol 60 ml. Après pulvérisation, on place les feuilles 10 minutes à l'étuve à 115°C. Les taches acides apparaisent en brun foncé sur fond ocre pâle. L'avantage de ce révélateur sur les indicateurs de pH, tels que le bleu de bromophénol ou le rouge de méthyle est que la coloration des taches ne s'altère pas.

Identification des taches.

α. Par leur position sur le chromatogramme et par comparaison avec celle d'acides témoins.

β. Par renforcement des taches, par adjonction de témoins internes aux dépôts initiaux.

γ. Par la mesure des Rg (les Rf ne sont plus mesurés par rapport au front du solvant, mais par rapport à l'acide glycolique; ainsi mesurés ils prennent le nom de Rg).

δ. Par révélations différentielles et par examen à la lumière de Wood (Carles et coll., 1958; Laturaze, 1959).

— au nitrate d'argent ammoniacal selon Partridge (1946) (NO_3Ag 1,5 N + NH_4OH 1,5 N en quantités égales);

— à l'aide de la solution suivante : ferricyanure de K à 0,3 % + Cl_3Fe à 0,3 % en quantités égales.

b) Les acides organiques aromatiques

Nous avons recherché la formation d'acides aromatiques parmi les produits du catabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine.

1. *Extraction*

10 ml de liquide d'incubation sont acidifiés par quelques gouttes d'acide formique (pH ≠ 2) : les bactéries floculent, les protéines précipitent, les acides sont libérés de leurs sels, tout métabolisme est arrêté.

Ce liquide est soumis à une évaporation à sec au bain-marie à 80°C, sans centrifugation préalable car une partie des acides aromatiques reste adsorbée sur les bactéries. En effet, nous avons remarqué que les taches d'acides aromatiques étaient plus importantes sur le chromatogramme si nous n'avions pas préalablement soustrait les bactéries du milieu d'extraction.

Le résidu sec est soumis à une extraction éthérée. Une partie aliquote de l'éther sert à faire le dépôt au point de départ du chromatogramme. Il est inutile de purifier l'extrait sur colonne de résine.

2. *Chromatographie*

Les acides aromatiques ont un Rf élevé dans les solvants précédemment utilisés pour les acides aliphatiques; ils suivent pratiquement le front des solvants acides et alcalins, et il en résulte une mauvaise résolution. C'est pourquoi *leur séparation* est réalisée sur papier Arches 304 par méthode ascendante monodimensionnelle dans le solvant tamponné de Fewster et Hall (1951).

Ethanol.	40 volumes
Butanol.	11 volumes
Tampon $NH_4OH/CO_3(NH_4)_2$. . . .	19 volumes

(volume égal des solutions 1,5 N).

La révélation des taches se fait au rouge de méthyle tamponné après passage du chromatogramme à l'étuve à 105°C pour chasser le CO_2 du papier (5 mn) et au réactif de Millon pour discerner les acides phénoliques.

L'identification des acides se fait, d'une part, en les repérant à l'aide d'un témoin interne, d'autre part, à l'aide de réactions colorées (Carles et coll., 1958).

c) Les acides indoliques

Ces composés ont été mis en évidence dans les produits de dégradation du tryptophane par les bactéries de la panse.

1. *Extraction des composés indoliques*

L'incubat de 24 heures est acidifié à pH # 3 avec HCl N et soumis à une extraction éthérée (deux fois 50 ml d'éther pour 50 ml d'incubat). Les extraits éthérés sont évaporés à froid et à l'obscurité. Le résidu est repris par 1 ml d'éthanol et soumis à la chromatographie.

2. *Séparation et identification des composés indoliques*

L'extrait éthanolique est chromatographié sur papier dans cinq solvants différents.

Les taches sont faites avec 50 μl sur papiers Arches 302 et 304 et Whatman 3.

(1) Butanol/acide acétique/eau 4:1:5 (v/v.) : Arches 302 (descendant).

(2) Isopropanol/NH_4OH/eau 10:1:1 (v/v.) : Whatman 4 (ascendant).

(3) Solvant ammoniacal tamponné : Arches 304 (ascendant).

(4) Solution de chlorure de potassium à 20 % : Arches 302 (descendant).

(5) Ether de pétrole/méthanol/eau 100:100:50 (v/v.) : Arches 302 (ascendant).

Les chromatogrammes sont séchés et révélés avec les réactifs suivants :

Réactif de Salkowski :

Acide perchlorique à 60 %	5	ml
Cl_3Fe	0,5	ml
Eau distillée qsp	100	ml

Réactif d'Ehrlich :

p-diméthyl-aminobenzaldéhyde	0,5	g
Ethanol à 95°	99	ml
HCl concentré	1	ml

p-nitraniline azotée :

p-nitraniline	0,3	g
HCl à 8 %	100	ml
NO_2Na à 5 %	6	ml

On dissout la p-nitraniline dans l'acide chlorhydrique et on mélange extemporanément cette solution avec celle de nitrite de sodium.

On révèle le chromatogramme successivement avec ce mélange et avec une solution de CO_3Na_2 à 20 %.

Les composés indoliques sont ainsi identifiés par leurs Rf, leurs réactions colorées caractéristiques et la migration de témoins internes.

d) Les acides volatils de C_1 a C_6

On sait que ce sont les produits terminaux du métabolisme bactérien dans la panse. Leur recherche est donc indispensable dans l'étude de toute réaction métabolique concernant un substrat pur (acides organiques fixes, acides aminés, par exemple).

Nous avons utilisé deux techniques de séparation :

1. La chromatographie sur papier mise au point par Guillaume et coll. (1956) ;
2. La chromatographie en phase gazeuse.

1. *Préparation des solutions d'acides*

Entraînement à la vapeur d'eau.

Les acides volatils contenus dans 10 à 20 ml du milieu d'incubation sont déplacés par 1 ml de SO_4H_2 concentré et soumis à l'entraînement à la vapeur d'eau dans l'appareil de Parnas. On arrête la distillation lorsque l'on a recueilli 250 ml de liquide.

Dosage de l'acidité volatile totale.

On élimine le CO_2 par barbotage d'azote pendant 3 mn. Le titrage est fait à la NaOH N/20 en présence d'ortho-crésol-sulfone-phtaléine en solution aqueuse à 1 %.

Concentration de la solution d'acides.

Après addition d'un léger excès de NaOH, on concentre par ébullition jusqu'à 1 ml environ. Pour éliminer l'ion sodium du résidu d'évaporation nous avons utilisé l'Amberlite IR - 120 - H qui retient les cations. Après agitation, on laisse 5 mn en contact, puis on filtre sur laine de verre dans un petit entonnoir. La résine est lavée à l'eau distillée par fractions de 1 ml. Dans le cas de la chromatographie sur papier, le filtrat et les eaux de lavage sont recueillis dans un tube contenant une quantité de morpholine N/I correspondant aux acides volatils titrés. La liqueur acide filtrante est jaune, elle vire au rouge au contact de la morpholine. On arrête le lavage lorsque l'indicateur devient orangé. On a ainsi recueilli tous les acides titrés initialement. On ajoute alors une goutte de morpholine pure afin de fixer les acides. Cette solution bouchée au caoutchouc se conserve en chambre froide.

2. *Chromatographie sur papier*

Le papier utilisé est le Whatman 3. Les acides sont déposés sur le papier par fractions de 5 μl. Entre chaque addition on laisse sécher la tache à la température du laboratoire. Dès que les taches de départ sont sèches, on effectue la chromatographie en phase descendante dans le solvant suivant :

n-butanol	30	ml
cyclohexane	30	ml
propane diol 1-2	10	ml
NH_4OH à 22°B	0,7	ml
Morpholine	0,07	ml
Eau	3,5	ml

Après une migration de 12 heures, on retire les feuilles de la cuve à chromatographie et on les fait sécher pendant 20 mn à la température du laboratoire.

Révélation.

On pulvérise un indicateur tamponné dont la formule est la suivante :

Solution indicatrice

O-crésol-sulfone-phtaléine.	0,2 g
NaOH N.	0,3 ml
Eau distillée.	15 ml
Après dissolution ajouter :	
Alcool à 95°.	70 ml

Solution tampon

Solution aqueuse de véronal sodique à 10 % (P/V.).	100 ml
Alcool à 95°.	150 ml

On mélange avant l'emploi 1 partie de la solution tampon pour 3 parties de la solution indicatrice.

On fait d'abord une pulvérisation légère sur l'envers; puis, sur l'endroit, on pulvérise jusqu'à l'obtention de taches jaunes sur fond rouge violacé. Après 5 minutes, on examine les taches par transparence et on les entoure d'un trait de crayon.

Cette méthode est délicate mais donne à l'expérimentateur qui sait la manier des résultats constants si bien que les auteurs l'ont utilisée à des fins semi-quantitatives dans la détermination du type fermentatif des bactéries anaérobies.

3. *Chromatographie en phase gazeuse*

Les acides volatils sont entraînés par la vapeur d'eau dans l'appareil de Parnas, titrés par la NaOH N/10. On ajoute un léger excès de NaOH et on concentre jusqu'au volume de 1 ml environ.

Les acides sont libérés de leurs sels par contact avec des résines échangeuses de cations. Les résines sont rincées trois fois avec de l'éther afin de recueillir le moins possible d'eau qui perturbe les chromatogrammes. Les acides se trouvent ainsi en partie dissous dans l'eau et en partie dissous dans l'éther.

La méthylation s'effectue dans ces deux phases par utilisation d'une solution éthérée de diazométhane. Les esters méthyliques plus solubles dans l'éther que dans l'eau passent dans cette première phase. On recueille la phase

éthérée que l'on concentre par évaporation de l'éther à 40°C.

L'analyse chromatographique est effectuée sur 1 µl du mélange d'esters méthyliques. La séparation s'effectue sur colonne de célite imprégnée de 20 % de dioctylphtalate, colonne utilisée par James et Martin (1956), en acier inoxydable de 2 m de longueur, 4 mm de diamètre intérieur et 5 mm de diamètre extérieur, à la température de 80°C avec un débit d'hélium de 3 l/h.

L'appareil de chromatographie gaz-liquide que nous utilisons est de marque Jobin et Yvon, modèle Bretagne, avec détection par catharomètre.

Les résultats sont très satisfaisants du point de vue qualitatif : les pics représentant les différents esters méthyliques sont bien séparés. Mais on ne peut pas utiliser cette méthode quantitativement : en effet, les esters méthyliques des acides à courtes chaînes sont volatils et il y a des pertes, par entraînement, non seulement au moment de la préparation des esters mais surtout lors de la concentration de la phase éthérée.

Cette méthode est plus élégante et plus rapide que la précédente; et, de plus, elle permet d'obtenir des diagrammes que l'on peut comparer entre eux.

2° CHROMATOGRAPHIE DES ACIDES AMINÉS

Nous avons appliqué cette technique à l'étude des hydrolysats protéiques des corps bactériens, à la mise en évidence des acides aminés du « pool » intrabactérien, à l'évolution d'un acide aminé donné dans les liqueurs d'incubation *in vitro* (cinétique de disparition, apparition de nouveaux acides aminés).

a) Préparation des extraits a chromatographier

1. *Hydrolysats protéiques*

10 mg de corps bactériens desséchés sont hydrolysés par 3 ml de HCl 5,6 N dans une ampoule scellée, à l'étuve à 105°C pendant 24 h. L'hydrolysat est évaporé à sec pour chasser le HCl. Le résidu sec est repris par 2 ml d'eau. La tache est faite avec 25 µl.

2. *Les acides aminés libres intracellulaires*

Les bactéries recueillies par centrifugation sont lavées deux fois à l'eau distillée puis séchées à l'acétone et sous vide. Les acides aminés libres sont extraits des bactéries sèches par agitation continue pendant 24 h dans de l'éthanol à 75 %. Les extraits éthanoliques sont traités avec du chloroforme dans une ampoule à décantation selon le pro-

cédé de Lindan et Work (1951). La phase aqueuse surnageante contient les amino-acides; une partie aliquote sera déposée au point de départ du chromatogramme après concentration.

3. *Les acides aminés des liqueurs d'incubation*

Les échantillons (10 ml) des liquides d'incubation prélevés à heures régulières sont centrifugés après précipitation des protéines par l'acide formique. Le liquide surnageant est purifié par contact avec une résine cationique (Amberlite IR - 120 - H). Cette purification s'effectue dans de petites fioles bouchées à l'émeri; on agite plusieurs fois et on laisse en contact une demi-heure. Après rejet du liquide et rinçage à l'eau distillée, on élue avec 10 ml de NH_4OH 2N que l'on laisse également en contact 30 minutes. Les résines sont ensuite rincées trois fois avec de l'eau distillée. Cette technique est plus rapide que le passage sur colonne. On réunit l'éluat et les eaux de rinçage que l'on fait évaporer à sec sur un bain-marie bouillant. L'extrait est repris par 1 ou 2 ml d'eau et soumis à la chromatographie sur papier à une ou deux dimensions.

b) Chromatographie

Papier : Arches 302.
Solvants :

Première dimension :

n-butanol.	4 volumes
Ac. acétique.	1 volume
Eau distillée.	5 volumes

Deuxième dimension :
Phénol saturé d'eau.

Révélateur : Ninhydrine à 0,25 % dans de l'acétone.

B. **Techniques biophysiques et biochimiques**

1° DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES

a) Dosage de l'acidité volatile

Elle est estimée soit dans le liquide du rumen, soit dans les milieux artificiels d'incubation. Le protocole expérimental a été décrit dans le chapitre de la chromatographie des acides volatils.

b) Dosage de l'acidité organique totale et de l'acidité organique fixe

Nous avons utilisé une méthode de titrage électrométrique adaptée de Pucher, Wakeman et Vickery (1941).

1. *Principe*

Les acides organiques sont des acides faibles. La plus grande partie de l'effet tampon de leurs sels se manifeste entre les pH 8 et 2,6. Une détermination de cet effet tampon par un acide fort permet de les évaluer quantitativement.

2. *Technique*

On prend quelques millilitres de la solution d'acides et on complète à 10 ml avec de l'eau déminéralisée. On ajoute 1 ml de NO_3H N et on porte à douce ébullition pour chasser le gaz carbonique dont la présence fausserait le dosage.

Le milieu est alcalinisé à un pH supérieur à 8 par de la soude 0,5 N fraîchement préparée (sans CO_2), puis il est ajusté à pH 8 par le jeu de solutions de NaOH et de NO_3H N/20. On fait alors le dosage avec de l'acide nitrique N/20 jusqu'à pH 2,6. Le dosage est ainsi terminé, mais il est possible d'en vérifier l'exactitude sur cette même solution. En ajoutant de la soude on revient à un pH supérieur à 8 et on recommence le dosage comme ci-dessus (pH-mètre Metrohm).

L'écart maximum entre deux « doubles » est inférieur à 1 % ; l'écart entre deux échantillons est de l'ordre de 1 %.

3. *Corrections*

Ce dosage est très simple, mais demande un certain nombre de corrections.

La première correction doit tenir compte des réactifs. On détermine par un dosage à blanc, en partant de 2 ml d'alcool et de 8 ml d'eau portés à pH 8 par de la NaOH, la quantité de NO_3H N/20 nécessaire pour ajuster à pH 2,6.

Cette quantité devra être soustraite du dosage des acides organiques. Il faut aussi tenir compte de la présence éventuelle d'acides minéraux faibles susceptibles de s'ajouter aux acides organiques.

L'acide phosphorique serait le plus gênant, mais l'extraction alcoolique n'entraîne que des quantités infimes de phosphates comme le montrent les chromatogrammes.

L'acide sulfurique intervient aussi par sa deuxième fonction acide. On en dose 3,6 % d'après les auteurs de la méthode. Mais l'extraction alcoolique nous met également à l'abri de cette erreur.

D'autre part, les acides organiques ne sont pas totalement dosés par cette méthode. Certaines fonctions acides relativement fortes, comme l'une des fonctions de l'acide

oxalique ne sont pas déterminées par ce dosage. Carles et coll. (1963) dosent séparément l'acide oxalique après sa précipitation par un sel de Ca dans les tissus végétaux riches en oxalates. Mais un dosage séparé de cet acide n'est pas justifié dans le cas de la liqueur de rumen habituellement pauvre en oxalates.

Pucher et coll. admettent un rendement de 90 % et ce point de vue nous a paru raisonnable.

4. *Expression des résultats*

La quantité totale d'acides organiques est calculée d'après la quantité de NO_3H N/20 utilisée pour le dosage en tenant compte des corrections énoncées ci-dessus.

L'acidité organique peut donc être évaluée directement en milli-équivalents. Mais on peut également l'exprimer en poids, il faut pour cela faire choix d'un poids moléculaire moyen pour les acides dosés.

Les acides volatils sont bien connus : leur poids moléculaire varie de 46 à 116 et l'acide acétique représente à lui seul 60 % de l'acidité volatile totale. Le coefficient adopté pour passer de l'acidité en milli-équivalents à son expression pondérale en milligrammes est de 75.

Les acides fixes dont la plupart ont été identifiés par chromatographie, peuvent être représentés par un poids moléculaire moyen de 120.

Il est évident que ces résultats pondéraux ne sont qu'approximatifs mais ils permettent des comparaisons avec les chiffres donnés par beaucoup d'auteurs.

Dosage de l'acidité organique totale.

La technique indiquée est appliquée à 2 ml d'extrait alcoolique, soit l'équivalent de 4 g de jus de rumen.

Dosage de l'acidité organique fixe.

Les extraits alcooliques sont passés sur colonnes de résines échangeuses de cations (Dowex 50 dans sa forme — H) pour libérer les acides de leurs sels; les colonnes sont rincées avec un volume connu d'alcool à 80°.

Une partie aliquote de l'effluent de chaque échantillon, correspondant à 8 g de jus de rumen, est pipetée dans de petites capsules. On fait évaporer à sec, à température d'environ 60°C, et sous ventilation pour chasser les acides volatils.

L'extrait sec de chaque capsule est repris par 2 ml d'alcool à 80°. Chaque capsule est rincée plusieurs fois avec 8 ml d'eau au total. Après mélange de l'extrait alcoolique

et des eaux de lavage, on effectue le dosage des acides organiques fixes au pH-mètre, comme il a été indiqué plus haut.

2° DOSAGE DES COMPOSÉS AZOTÉS

a) Dosage de l'azote total déterminé par la méthode de Kjeldahl

Ce dosage est effectué sur la liqueur d'incubation ou sur des bactéries séchées, par la méthode classique de Kjeldahl.

b) Dosage de l'azote ammoniacal

L'azote ammoniacal est dosé dans les suspensions bactérienne incubées *in vitro* et dans le jus de rumen sur 100 ou 200 μl de filtrat.

Plusieurs modifications de la méthode classique de Conway (1950) ont été apportées par Seligson et coll. (1951) pour déterminer des quantités d'azote inférieures à 25 μg. Nous nous sommes inspirée de la méthode de Seligson que nous avons vérifiée avec le plus grand soin et que nous avons alors appliquée au matériel biologique très spécial que constitue le jus de rumen.

1. *Principe de la méthode*

La méthode est basée sur la diffusion de l'ammoniac qui, déplacé de ses sels par une base fixe, vient se fixer sur SO_4H_2 N. Le SO_4 $(NH_3)_2$ formé est dosé colorimétriquement au réactif de Nessler.

2. *Description de la technique*

Réactifs.

- Réactif de Nessler suivant Vanselow (IK 34,9 g - HgI_2 45,5 g - KOH 112 g - H_2O distillée qsp. 1 000 ml).
- Solution de SO_4H_2 N.
- CO_3K_2 R.P. ou lessive de NaOH pure.
- Solution mère standard d'oxalate d'ammonium R.P. Dissoudre 507,14 mg d'oxalate dans de l'eau bidistillée et compléter à 100 ml. Cette solution renferme 100 mg d'azote.

Mode opératoire.

Courbe étalon.

On prépare à partir de la solution mère d'oxalate d'ammonium, par dilution au 1/100 et au 1/50, des solutions contenant 10 et 20 μg/d'azote par ml. On prélève des parties aliquotes, de volume inférieur ou égal à 1 ml, représentant des quantités d'azote échelonnées entre 5 et 25 μg.

Ces prises d'essais sont introduites dans des flacons de pénicilline et on complète, s'il y a lieu à 1 ml avec de l'eau bidistillée. On fait un témoin avec 1 ml d'eau bidistillée. On ajoute ensuite le CO_3K_2 (1 g environ) et l'on ferme rapidement à l'aide des bouchons munis de petits agitateurs de verre à bout rodé, la partie rodée des agitateurs ayant été préalablement trempée dans une solution de SO_4H_2 N.

Les flacons bouchés sont ensuite soumis à une agitation rotative (35 tours/mn) pendant 30 minutes; ce qui facilite la diffusion de NH_3.

Le NH_3 se fixe sur SO_4H_2 et donne $SO_4(NH_4)_2$.

On distribue, dans de petites capsules, 5 ml exactement mesurés du réactif de Nessler dilué cinq fois.

On y trempe les agitateurs imprégnés de $SO_4(NH_4)_2$ et on effectue la mesure de densité optique au spectrophotomètre Jobin et Yvon à 420 mμ dans des cuves de 1 cm d'épaisseur.

A titre d'exemple voici 5 groupes de 10 mesures pour des quantités d'azote allant de 5 à 25 μg (tableau I).

TABLEAU I

Etalonnage de la courbe d'azote ammoniacal

AZOTE	DENSITÉS OPTIQUES ($\times 10^2$)										Moyennes
5 μg	19,5	19,8	18,5	18	19,7	20	18	17,5	18,5	17,5	18,70
10 μg	37	38	38,5	37,5	38	37,5	38	39	38	38	37,95
15 μg	59,5	61	59,5	57,5	61	58	58	59	58,5	60	59,20
20 μg	80	82	78,5	79	78	80	78,5	78	80	81	79,50
25 μg	100,5	100	99	98,5	100	101	99,6	98,8	100	102	99,94

On porte les concentrations en abscisses et les densités optiques en ordonnées (fig. 3).

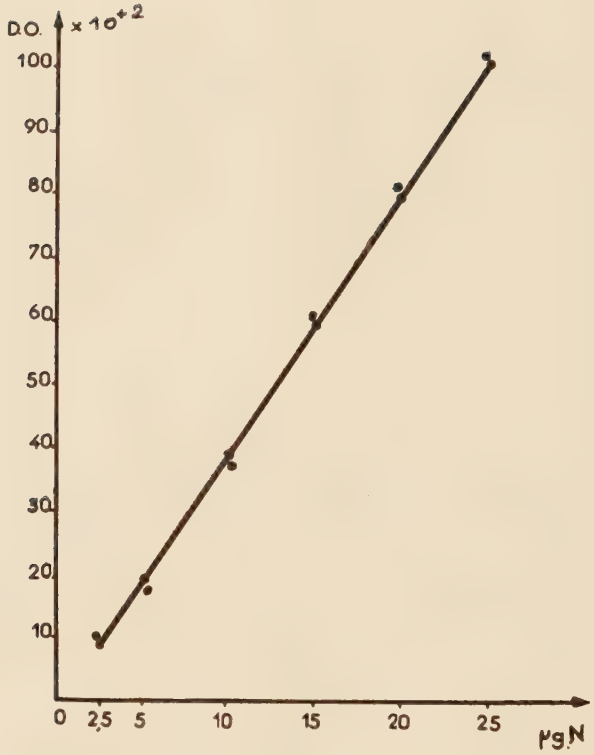


FIG. 3
Courbe étalon de l'azote ammoniacal

On peut ajuster légitimement (coefficient de sécurité > 95 %) une droite à ce nuage de points et l'expérience nous a montré que cette droite d'étalonnage reste valable pour tous dosages ultérieurs.

3. *Applications aux milieux biologiques*

α) Dosage de l'azote ammoniacal.

Il peut être dosé directement dans les liquides biologiques tels l'urine, le sérum, les liqueurs de digestion, etc.

Voici quelques exemples de doubles dans les liqueurs de panse des bovins :

39,5	40
47,4	48,5
64	64,5
67	67
55	54,8
42	42

β) Dosage de l'azote total.

— Minéralisation.

On procède à la minéralisation suivant KJELDAHL puis au dosage.

— Dosage.

Les liquides de minéralisation sont dilués et ajustés à un volume connu dans des fioles jaugées, de telle sorte qu'une prise inférieure ou égale à 1 ml contienne entre 5 et 25 µg d'azote (de préférence entre 10 et 25 µg). Les prises de 1 ml sont traitées comme il est indiqué ci-dessus pour la courbe étalon; toutefois, lorsque la liqueur est trop acide, le CO_3K_2 n'est plus assez fort pour déplacer l'ammoniac, on se sert alors de lessive de NaOH pure.

4. *Précision de la méthode*

— Sur des solutions pures d'acides aminés.

TABLEAU II

	N TOTAL DE LA PRISE	N RETROUVÉ	MOYENNE	TAUX DE N RETROUVÉ (%)
Alanine.	12,58	12,55 - 12,50 - 12,64	12,56	99,8
Ac. aspartique. ..	14	13,80 - 14,15 - 13,72	13,85	98,9
Ac. glutamique. .	12,60	12,50 - 12,40 - 12,55	12,48	99
Leucine.	14,21	14,40 - 14,25 - 14,10	14,25	100,2
Phényl-alanine. ..	11,28	11,40 - 11,55 - 11,35	11,43	101,3
Valine.	11,96	12,25 - 12,00 - 12,15	12,13	101,4

Les résultats sont exprimés en µg d'azote/ml.

— Sur des milieux biologiques divers, en comparaison avec la méthode classique de Parnas.

TABLEAU III

	PARNAS	NESSLER	
Peptones.	7,35	7,30	7,35
Bactéries lot I.	8,15	8,10	8,25
Bactéries lot II.	7,95	8	8

Les résultats sont exprimés en µg d'azote/ml.

5. *Conclusion*

Cette méthode relativement rapide permet de travailler sur un grand nombre d'échantillons à la fois. Les erreurs maximales pour 5, 10, 15, 20 et 25 µg sont respectivement

+ 0,4, — 0,4, + 0,5, + 0,5 et + 0,6. La méthode est donc précise entre 15 et 25 μg. Elle est fidèle : nous avons obtenu les mêmes valeurs pour établir la courbe étalon à six mois d'intervalle.

c) Dosage de l'azote aminé

Nous nous sommes adressée à des techniques chromatographiques pour doser les acides aminés libres du « pool » intrabactérien et pour étudier la cinétique de disparition des acides aminés cycliques au cours des heures d'incubation.

— *Techniques.*

1. *Par méthode colorimétrique*

Après chromatographie sur papier en une dimension dans le solvant butanol/ac. acétique/eau, les acides aminés sont révélés à la ninhydrine selon une méthode mise au point par Raynaud (1959).

Les taches sont ensuite découpées et éluées dans des tubes contenant 5 ml d'un mélange éthanol/eau 60:40 (v/v) puis dosées colorimétriquement à 570 mμ.

On établit chaque fois une courbe étalon dans des conditions semblables. Raynaud (1959) estime l'erreur de cette méthode à 12 %.

Par cette méthode nous avons dosé les acides aminés libres (le dosage se fait alors en fonction de l'acide glutamique), l'histidine, le tryptophane, la phénylalanine.

Pour la phénylalanine : on utilise la couleur bleue caractéristique obtenue en pulvérisant une solution aqueuse de bicarbonate de sodium sur le chromatogramme déjà révélé à la ninhydrine. Les autres acides aminés s'effacent. On élue avec le n-butanol et on lit la densité optique à 600 mμ (Pasieka et Morgan, 1956).

2. *Par méthode densitométrique*

On fait une lecture directe des taches du chromatogramme à l'aide du densitomètre enregistreur Jouan.

Nous avons utilisé cette méthode pour l'histidine dont le métabolisme passe par l'acide glutamique. Les pourcentages de ces deux acides aminés étaient ainsi déterminés simultanément.

3. *Par méthode de* Scriban (1951)

Pour la proline, l'hydroxyproline et la tyrosine, nous avons utilisé la méthode de Scriban : c'est une méthode visuelle, moins spectaculaire que les précédentes, mais peut être plus exacte pour un œil exercé. On établit une gamme étalon de taches de 2 en 2 μg et on compare subjectivement

la tache à doser à celle dont la surface et l'intensité de coloration se rapprochent le plus.

3° ÉTUDE DE LA DÉCARBOXYLATION DES ACIDES AMINÉS ET DES ACIDES ORGANIQUES

Le métabolisme des acides aminés et des acides organiques par les bactéries du rumen aboutit, en général, à la formation d'acides gras volatils. Pour étudier le mécanisme des processus de dégradation de ces composés, nous avons eu recours à la technique manométrique de Warburg : la mesure des dégagements gazeux, et, en particulier du gaz carbonique, est effectuée avec des suspensions lavées de bactéries dans le tampon phosphates (pH 6,8) en présence du substrat.

Pour avoir des expériences reproductibles, nous avons mesuré la turbidité de la suspension diluée au 1/100 au spectrophotomètre spectral Junior Jouan à 560 $m\mu$ de telle sorte que la lecture soit comprise entre 70 et 65 % de transmission lumineuse.

La suspension bactérienne (1,6 ml) est distribuée dans la chambre principale des fioles de Warburg à deux tubulures latérales; dans l'une on place 0,4 ml de la solution, dans le tampon phosphates, de l'acide aminé ou de l'acide organique à étudier, dans l'autre 0,3 ml de SO_4H_2 10 N. Certaines fioles contiennent 0,1 ml de KOH à 25 % dans le puits central. Les témoins sont préparés de même avec 0,4 ml de tampon phosphates dans la tubulure latérale à la place du substrat.

Les fioles sont adaptées aux manomètres correspondants et mises dans un bain à 38°C. On fait passer de l'azote rectifié (débarrassé des traces d'O_2). Quand l'équilibre thermique est atteint, le substrat est ajouté à la suspension bactérienne. Les lectures du gaz dégagé sont faites toutes les heures pendant 8 heures, puis à 20 heures et à 24 heures pour les acides aminés; pour les acides organiques, beaucoup plus vite catabolisés, les lectures sont effectuées toutes les 10 minutes pendant 80 minutes.

A la fin de l'expérimentation, l'acide sulfurique de la tubulure de la fiole est additionné à l'incubat ce qui arrête tout métabolisme, fixe l'ammoniac et permet au gaz carbonique dissous dans le tampon de se dégager.

La quantité totale de gaz dégagé est mesurée, diminuée du témoin correspondant et exprimée en μl de CO_2. Le gaz dégagé dans les fioles contenant de la potasse est du méthane.

4° DOSAGE DE LA TRYPTOPHANASE

Nous avons estimé la tryptophanase sur des poudres acétoniques préparées soit à partir de bactéries de rumen, flore globale, soit à partir de souches pures.

Préparation des poudres acétoniques.

Les souches pures indologènes ont été séparées sur des milieux sélectifs. Une colonie isolée est repiquée dans un bouillon. Les suspensions lavées de l'ensemble de la microflore et le bouillon qui contient la souche pure servent d'inoculum au milieu suivant : 1 % de peptones, 1 % d'extrait de levures, 0,5 % de PO_4HK_2 et 0,1 % de glucose dans de l'eau distillée.

Ce milieu est préalablement stérilisé quand il s'agit d'une espèce pure.

On met la culture pendant 24 heures dans une étuve réglée à 30°C. Si l'on repique les bactéries deux ou trois fois dans le milieu inducteur, on augmente progressivement leur activité enzymatique. Les microorganismes sont ensuite centrifugés, mis en suspension dans de l'eau distillée et déshydratés par 10 volumes d'acétone à — 20°C. On les recueille sur filtre Büchner après un nouveau passage d'acétone.

Ces poudres acétoniques se conservent très bien, une semaines, dans un dessiccateur sous vide. Néanmoins ces poudres ont toujours été utilisées le lendemain de leur préparation.

Technique analytique.

L'activité enzymatique est déterminée par le dosage de l'indol formé lors de la dégradation du trytophane (Wood et coll., 1947).

Là encore nous avons été amenée à rechercher les conditions expérimentales permettant l'application de cette méthode à notre matériel.

Les milieux sont étudiés dans des tubes à essais bouchés à l'émeri. On fait varier les facteurs qui interviennent dans le processus : pH, concentrations en substrat et en enzyme, durée d'action :

Tampon phosphates de Sörensen pH variable de 5,2 à 10	1,6 ml
Phosphate de pyridoxal (20 μg)	0,2 ml
Solutions de tryptophane de M/800 à M/20	0,2 ml
Matériel enzymatique	de 0,5 à 10 mg

Les tubes sont placés au bain-marie à 37°C. On arrête la réaction successivement dans chaque tube de 10 en

10 minutes par l'addition de 0,2 ml d'acide trichloracétique à 100 % (P/V).

On ajoute 2 ml de toluène, on agite. Le toluène dissout l'indol.

Dosage de l'indol.

L'indol est dosé par la méthode d'Ehrlich (Colowick-Kaplan) dans 1 ml de toluène. L'addition de p-diméthyl-amino-benzaldéhyde et d'alcool acide [éthanol/SO_4H_2 80:20 (v/v)] provoque une coloration rose qui se forme au bout de 10 minutes et dont on mesure la densité optique au spectrophotomètre Jobin et Yvon à 450 mμ.

On établit une courbe de référence d'indol dans les mêmes conditions. Les conditions retenues seront exposées dans le texte.

III. TECHNIQUES BACTÉRIOLOGIQUES

Nous nous sommes attachée à isoler et à identifier, dans la mesure du possible, les espèces qui jouent un rôle dans le catabolisme des acides aminés cycliques.

A. Cultures sélectives par la méthode d'enrichissement du milieu

Les bactéries sont prélevées soit sur des bovins d'abattoir, soit sur des moutons fistulisés dont la nourriture se compose de foin, de luzerne et d'avoine.

50 ml de suspension bactérienne (milieu rumen) sont incubés 24 heures à 39°C en présence de 0,1 mmole d'acide aminé et de 0,2 g de maltose. 10 ml de liqueur d'incubation sont repiqués dans 40 ml de tampon phosphates pH 6,8 enrichi de cystéine, de CO_3Na_2, en plus de l'acide aminé et du sucre, et mis à incuber 24 heures. Cette opération est répétée une fois encore.

La dernière culture va servir d'inoculum aux milieux gélosés d'isolement.

B. Préparation des milieux d'isolement

La méthode utilisée est inspirée de celles de Hungate (1950) et d'Appleby (1955), mais notre milieu est encore plus sélectif que celui de ce dernier auteur.

Sa composition est la suivante :

Solution saline *a* (PO_4HK_2 0,2 %)	25 ml
Solution saline *b* (PO_4H_2K 0,2 %, NaCl 0,6 %, SO_4Mg 0,06 %, $CaCl_2$ 0,06 %, $SO_4(NH_4)_2$ 0,3 %)	25 ml

Glucose		0,2	g
Maltose		0,2	g
Peptones	facultatifs	1	g
Extrait de levures	facultatifs	0,5	g
Eau distillée		40	ml
Jus de rumen clarifié par centrifugation et passage sur filtre Seitz		50	ml
Agar-agar		3	g

On fait bouillir et on stérilise à l'autoclave à 115°C pendant 25 minutes. Parfois le milieu précipite; on le décante alors dans une fiole stérile.

On le maintient au bain-marie à 50°C jusqu'à utilisation. On ajoute aseptiquement :

une solution de CO_3Na_2 à 6 %	5	ml
une solution de cystéine à 1 %	2,5	ml
une solution de l'acide aminé à 2 %	5	ml

Ces différentes solutions sont stérilisées au moment de l'emploi par passage sur bougie de porcelaine L_3. Pendant la répartition de ce milieu en tubes stériles, on injecte un courant de CO_2 stérile.

Variantes dans la composition du milieu d'isolement.

Suivant les conditions, comme on verra, nous avons utilisé des variantes de la formule ci-dessus.

a) *Substances azotées*

Est toujours présent l'acide aminé étudié.

Sont facultatifs : peptones, extrait de levures, $SO_4(NH_4)_2$ de la solution saline *b* qui est alors remplacé par SO_4Na_2.

b) *Substances glucidiques*

Sont toujours présents : glucose et maltose.

Est facultatif : le cellobiose.

Les bactéries sélectionnées par la méthode d'enrichissement du milieu sont amenées à une dilution convenable avec la solution saline stérile. Avec chaque dilution on ensemence une série de 10 tubes gélosés (à l'aide d'une pipette Pasteur fermée), selon la méthode d'épuisement du milieu. Les tubes ensemencés et refroidis sont mis à l'étuve à 38°C pendant 24 heures ou 48 heures ou davantage. Les colonies qui apparaissent, lenticulaires ou punctiformes ou en houppettes, avec ou sans gaz, sont en général bien isolées à partir du 5e ou 6e tube. En définitive, nous avons utilisé des formules variées pour essayer d'isoler un plus grand nombre de germes.

C. Isolement et purification d'une espèce

Une colonie isolée est prélevée aseptiquement à la pipette Pasteur et ensemencée dans un bouillon VF. Après 24 ou 48 heures d'étuve les germes se sont multipliés. Le bouillon dilué convenablement sert alors à ensemencer une nouvelle série de géloses. Une colonie séparée est repiquée sur bouillon VF. Nous obtenons ainsi une espèce pure. Il y a intérêt à passer deux fois par la colonie unique pour éviter le danger des cultures où deux anaérobies colonisent ensemble (PREVOT).

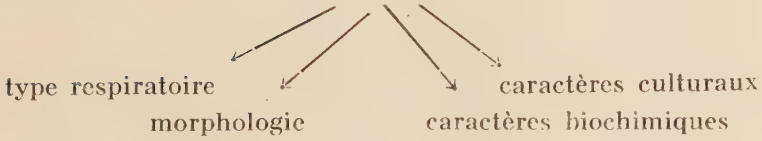
D. Identification d'une espèce

Le germe, une fois isolé et obtenu en culture pure, il faut le déterminer. Ici les germes ne sont ni toxinogènes, ni virulents et le diagnostic sera essentiellement biochimique.

On recherche d'abord le type respiratoire en ensemençant une série de géloses profondes; puis les caractères morphologiques, ensuite les caractères culturaux : en gélose profonde, sur gélose inclinée, sur gélose au sang, dans la gélatine, en eau peptonée, en bouillon glucosé, dans le lait; enfin les caractères biochimiques sont établis par l'étude de l'attaque des différents glucides, par la recherche des uréases, des catalases, de l'indol, de SH_2, de la réduction des nitrates en nitrites, des sulfites en sulfures.

L'ensemble de ces opérations peut être schématisé ainsi :

Prélèvement
↓
Culture sur l'acide aminé
par méthode d'enrichissement du milieu
↓
10 géloses profondes
↓
colonie isolée
↓
bouillon
↓
10 géloses profondes
↓
colonie isolée
↓
souche pure



PREMIÈRE PARTIE

Les Acides organiques non volatils dans la panse

S'il y a longtemps qu'ont été décelés, identifiés et dosés les acides volatils dans la panse, par contre, les recherches concernant les acides organiques non volatils sont plus rares.

Nous n'avons trouvé que quelques études partielles concernant les acides organiques fixes. *L'acide lactique* est de tous le plus étudié. C'est un produit intermédiaire caractéristique de la dégradation des hexoses. On a, en effet, observé son apparition :

— *in vivo*, dans la fermentation du glucose et des aliments riches en sucres, comme les rutabagas (Phillipson et Mc Anally, 1942), ainsi que dans celle du maïs (Phillipson, 1952 a) ;

— *in vitro*, dans la fermentation par les cultures mixtes du glucose (Woodman et Evans, 1938; Elsden, 1945) et même de la cellulose (Marston, 1948). Par contre, il ne s'en forme pas dans la dégradation des pentoses (Mc Naught, 1951; Heald, 1952).

Quant à *l'acide succinique*, Sijpesteijn et Elsden (1952) n'en trouvent que de très faibles quantités dans la panse même après le repas. Marston (1948) en identifie dans les produits de fermentation *in vitro* de la cellulose soumise à l'action des bactéries du rumen.

L'acide pyruvique a été signalé dans certaines fermentations, par les cultures mixtes, du glucose (Woodman et Evans. 1938) et de la cellulose (Marston). Il est cependant un produit intermédiaire fondamental de la formation des acides volatils comme le montrent les travaux de Elsden et coll. (1951) qui ont étudié la fermentation du pyruvate par un coccus Gram négatif, isolé du rumen de mouton.

Nous avons essayé de compléter et de préciser ces premiers

travaux par une étude de l'acidité organique non volatile du contenu du rumen tant des points de vue qualitatif que quantitatif. Nous avons ensuite recherché l'origine et le devenir de ces acides dans la panse, ce qui nous a conduite à nous intéresser aux acides aminés et aux acides volatils.

Fig. 4

Les acides non volatils de la liqueur du rumen.
Description d'un chromatogramme type (se référer au tableau IV)

TABLEAU IV

Identification des acides non-volatils de la liqueur du rumen

ACIDES	RG (par rapport à l'acide glycolique)		RÉACTIONS COLORÉES au NO_3Ag ammoniacal		au $Fe(CN)_6K_3$ + $FeCl_3$
	Solvant alcalin	Solvant acide	U.V.	Visible	
1 Sulfurique	0	0	Blanc	Blanc	Bleuté
2 Oxalique	0	30	Blanc	Gris rose	Blanc bleuté
3 Quinique	85	40	F. jaune	Ocre orangé	Gris rose
4 Chlorhydrique	120	25	Blanc	Gris violacé	Bleu
5 Glycérique	88	70	F. jaune	Jaune clair	Blanc
6 Malique	40	90	F. jaune	Blanc sale	Blanc
7 Glycolique	100	100	F. jaune	Ocre rose	Rose lilas
8 Malonique	30	110	Blanc	Blanc	Bleu pâle
9	115	116	—	Jaune	—
10 Succinique	48	125	Blanc	Blanc	Bleu vert
11 Lactique	125	125	F. jaune	Ocre jaune	Rose lilas
12 Fumarique	60	145	Blanc	Blanc sale	Bleu vert
13 Adipique	70	145	Blanc	Blanc rosé	Verdâtre
14	de 100 à 170	de 140 à 155	F.	Blanc	Bleuté
15			F.	—	—
16			F.	Rosé	Bleu vert
17			F.	Isabelle	Blanc

I. EXISTENCE D'ACIDES NON VOLATILS DANS LA PANSE

A. Mise en évidence d'acides organiques aliphatiques et aromatiques

Notre matériel de rumen a été prélevé sur quinze bovins d'abattoir. Le mélange d'acides de chaque contenu du rumen est extrait et purifié selon une technique que nous avons mise au point, puis il est analysé par la méthode de chromatographie à deux dimensions sur papier. Nous avons ainsi mis en évidence une quinzaine d'acides organiques fixes. La plupart d'entre eux ont pu être identifiés par leurs Rf ou Rg et par réactions colorées différentielles. On se reportera à la description d'un chromatogramme type (fig. 4) et au tableau IV qui comporte l'ensemble des résultats.

Discussion des résultats

Tous ces acides ne sont pas présents sur chaque chromatogramme. Les acides oxalique, malique et l'acide 9 sont souvent absents.

L'acide glycolique, toujours présent, est de tous les acides identifiés le plus abondant. On sait qu'il peut servir avec un bon rendement à la synthèse tissulaire de la glycine (Weinhouse et Friedmann, 1951).

L'acide lactique se manifeste souvent par une tache très nette, mais parfois seulement par de très faibles traces. La présence des acides *glycérique* et lactique est tout à fait normale puisqu'ils sont des étapes importantes dans la dégradation des glucides. On observe l'apparition massive d'acide lactique dans le rumen si l'on fait consommer à l'animal des rutabagas ou des betteraves, aliments riches en sucres (Phillipson et Mc Anally, 1942), ou *in vitro* si l'on fait incuber du saccharose avec des suspensions de bactéries.

L'acide succinique est toujours présent, mais en très petite quantité. En effet, bien qu'il soit le produit terminal principal de la fermentation de la cellulose par deux bactéries importantes dans le rumen :

Bacteroïdes succinogenes isolé par Hungate (1950),

Ruminococcus flavefaciens isolé par Sijpesteijn (1951),

il est rapidement décarboxylé en acide propionique volatil comme nous le verrons plus loin. D'autre part, notre attention est attirée par la très faible importance des acides du cycle de Krebs : sur les chromatogrammes nous trouvons assez souvent les acides succinique, malique, fumarique.

Nous n'avons jamais décelé d'acides citrique, aconitique, ni d'acides cétoniques. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'ils sont déviés vers la formation d'acides volatils comme cela a été montré pour les transformations du succinate en propionate (Sijpesteijn et Elsden, 1952), du pyruvate en acétate, n-butyrate, n-caproate et en petites quantités de propionate et de n-valérate (Elsden et coll., 1946).

L'acide oxalique est un acide fréquemment rencontré dans les plantes fourragères. Il doit être assez rapidement catabolisé par les bactéries de la panse, car on ne le trouve pas fréquemment sur nos chromatogrammes.

Quant à *l'acide quinique*, les travaux de Davis (1955) ont démontré qu'il pouvait être synthétisé par des mutants d'*Escherichia coli* à partir de l'érythrose et du phosphoénolpyruvate et qu'il était à l'origine des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine, tryptophane).

Le groupe d'acides mal séparés en phase alcaline, et à Rf élevé en phase acide (14, 15, 16, 17) n'a pas pu être identifié dans ces solvants. Nous avons eu recours au solvant alcalin tamponné de Fewster et Hall (1951) qui freine la migration de ces acides, pour obtenir une bonne séparation. Ce sont des *acides aromatiques* : ils sont en partie retenus sur échangeur cationique, ils sont adsorbés sur colonne de charbon, ils ont des Rf élevés dans les solvants précédents et ne se séparent bien que dans un solvant tamponné; acides faibles, ils se révèlent incomplètement avec le révélateur aniline-glucose. A l'aide de témoins internes et de réactions colorées, nous avons pu identifier les acides p-aminobenzoïque, phényl-acétique, phényl-propionique. Les acides aliphatiques ne migrent pas dans ce solvant, seul l'acide lactique a un Rf de 0,18. Ces acides aromatiques existent à l'état de traces dans la panse. Ils n'ont pu être bien identifiés qu'en ajoutant des surcharges en acides aminés précurseurs, comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

B. Dosage des acides organiques non volatils

Vu l'abondance des acides volatils dans la panse, il nous a paru intéressant d'évaluer l'acidité fixe et d'estimer sa concentration par rapport à l'acidité totale. Nous avons utilisé une méthode électrométrique (électrode de verre) dont on trouvera une description détaillée dans le chapitre des techniques. Les acidités organiques totale et fixe ont été déterminées successivement dans le contenu du rumen de quinze bovins d'abattoir.

Les résultats sont consignés dans les tableaux V et VI.

TABLEAU V

Acidité totale et acidité fixe de la liqueur du rumen

ANIMAUX	pH du jus	QUANTITÉ D'ACIDES dans 100 g de jus en milli-équivalents			ACIDITÉ fixe p. 100 d'acidité totale	QUANTITÉ D'ACIDES dans 100 g de jus en mg	
		Totale	Fixe	Volatile par différence		Totale	Fixe
1.	7,3	6,2	0,3	5,9	4,8	478	36
2.	7,4	4,8	0,3	4,5	6,2	374	31
3.	7,4	4,6	0,2	4,4	4,3	354	24
4.	7,5	5,1	0,3	4,8	5,9	397	36
5.	7,6	5,7	0,3	5,4	5,2	445	36
6.	7,6	5	0,2	4,8	4	384	22
7.	7,6	4,5	0,2	4,3	4,4	247	19
8.	7,6	5,4	0,2	5,2	3,7	414	21
9.	7,8	3,8	0,1	3,7	2,6	290	13
10.	7,8	3,2	0,1	3,1	3,1	253	17
11.	7,8	3,3	0,1	3,2	3	255	18
12.	8	3,1	0,1	3	3,2	228	18
13.	8,2	4,8	0,2	4,6	4,1	369	20
14.	8,2	2,9	0,1	2,8	3,4	222	11
15.	8,4	3,2	0,1	3,2	3,1	245	12
Moyennes et erreurs standards	7,7 ± 0,08	4,3 ± 0,26	0,2 ± 0,006	4,2 ± 0,24	4 ± 0,26	330 ± 20,3	22 ± 2,1

TABLEAU VI

Acidité totale et acidité fixe sont ici rapportées à la matière fraîche et à la matière sèche du contenu du rumen

ANIMAUX	MATIÈRE SÈCHE p. 100	QUANTITÉ D'ACIDES dans 100 g de matière fraîche en mg		QUANTITÉ D'ACIDES dans 100 g de matière sèche en mg	
		Totale	Fixe	Totale	Fixe
1.	10,2	747	58	7 323	568
2.	10,2	580	48	5 686	470
3.	10,2	280	20,5	2 714	198
4.	5,7	232	17,9	4 011	309
5.	10,4	601	34,5	5 778	331
6.	10,9	234	20	2 138	183
7.	9,1	277	29	4 142	318
8.	9,6	608	30,8	6 333	320
9.	8,5	439	19,7	5 164	231
10.	8,4	408	28,2	4 857	335
11.	9,4	404	25,4	4 297	270
12.	7,8	387	28,5	4 961	365
13.	10,4	236	16,8	2 259	161
14.	9,5	347	17,2	3 652	181
15.	11,5	372	18	3 235	156
Moyennes.	9,4	410	27,5	4 436	293

Discussion des résultats

Ce qui frappe tout d'abord dans ces résultats, c'est la faible valeur de l'acidité fixe par rapport à l'acidité totale : 2,6 à 6,2 % (moyenne 4).

Le contenu du rumen des animaux d'abattoir est toujours alcalin. Dans nos expériences le pH varie de 7,3 à 8,4. L'acidité fixe varie à peu près dans les mêmes proportions que l'acidité totale.

Nous avons calculé l'acidité volatile par différence pour comparer nos résultats avec ceux obtenus par Phillipson (1942), *in vivo*, chez le mouton soumis au jeûne. Cet auteur signale des valeurs qui s'étagent de 7,7 milli-équivalents après 24 heures de jeûne à 3,2 milli-équivalents après 48 heures de jeûne. Nos chiffres sont un peu inférieurs et varient de 6,3 à 2,8 milli-équivalents (5,9 correspondent exactement à 36 heures de jeûne du mouton de Phillipson).

Dans le tableau VI, l'acidité totale et l'acidité fixe sont exprimées en mg pour 100 g de matière fraîche et pour 100 g de matière sèche afin de faciliter la comparaison avec les chiffres donnés par beaucoup d'auteurs. C'est ainsi que Elsden et coll. (1946) évaluent pour le bœuf, l'acidité volatile à 6 g pour 100 g de matière sèche; pour le bœuf d'abattoir nous trouvons une moyenne de 4,4 g. L'acidité fixe varie-t-elle dans ces mêmes proportions ? Pour répondre à cette question, il faudra utiliser un animal fistulisé, non à jeun et dont la nourriture sera contrôlée.

D'autre part, le tableau VI ne prend toute sa valeur que par comparaison avec l'acidité des autres poches digestives. En effet, il existe de très grandes différences de concentrations entre leurs contenus. Dans le feuillet, par exemple, les ingesta sont beaucoup plus concentrés par suite de l'absorption de l'eau par cet organe.

A titre d'exemple, nous avons comparé dans le tableau VII les acidités totale et fixe des contenus de rumen et de feuillet de trois bovins d'abattoirs.

Les quantités d'acides totaux rapportées à la matière sèche sont trois à quatre fois plus élevées dans le rumen que dans le feuillet. Quant aux acides fixes, ils ont une concentration environ six fois plus grande dans le rumen. Ce qui prouve qu'il y a une absorption ou une métabolisation de ces acides dans le feuillet.

TABLEAU VII

Comparaison des acidités totale et fixe des contenus du rumen et du feuillet

ANIMAUX	MATIÈRE SÈCHE (p. 100)		QUANTITÉ D'ACIDES DANS 100 g DE MATIÈRE FRAÎCHE EN mg				QUANTITÉ D'ACIDES DANS 100 g DE MATIÈRE SÈCHE EN mg			
	RUMEN	FEUILLET	RUMEN		FEUILLET		RUMEN		FEUILLET	
			Acides totaux	Acides fixes	Acides totaux	Acides fixes	Acides totaux	Acides fixes	Acides totaux	Acides fixes
1	8,2	17,9	343,7	24	233,4	10,2	4 191	288	1 248	57
2	6,8	20,5	191,8	21	152,5	8,4	2 820	308	744	41
3	6,3	18,1	185,5	25,2	166	12,3	2 944	400	917	68

TABLEAU VIII

Influence du régime alimentaire et du repas sur les quantités d'acides organiques totaux et fixes dans le rumen de mouton

HEURES DES PRÉLÈVEMENTS	MOUTON ALIMENTÉ AVEC FOIN DE LUZERNE		MOUTON ALIMENTÉ AVEC FOIN DE LUZERNE ET NAVETS		MOUTON ALIMENTÉ AVEC FOIN DE LUZERNE ET PEPTONES	
	Acides totaux	Acides fixes	Acides totaux	Acides fixes	Acides totaux	Acides fixes
7 h	9,75	0,80	—	1,2	12	1,6
9 h	13,50	0,87	9,40	1,5	—	—
9 h 30	—	—	—	—	13,4	2,1
10 h	12,75	0,62	11,80	2,6	—	—
11 h	14,25	1,80	15,40	3,6	11,9	1,75
12 h	12,20	1,50	13,70	3,3	14,5	2,1
14 h	11	1,10	13,75	2,3	13,25	6,80
16 h	11	1,25	12,50	2,3	10,3	1,25
18 h	11,90	0,75	11	1,8	12,75	1,75

Les quantités d'acides sont exprimés en milli-équivalents/100 g de jus de rumen.

C. Variations des acides organiques fixes et totaux dans le rumen.

Influence du régime alimentaire et du repas

Protocole expérimental

Nous avons étudié les variations des acides organiques en fonction de trois régimes alimentaires à l'aide d'un mouton porteur d'une fistule permanente du rumen.

L'animal reçoit deux repas quotidiens et est soumis au même régime pendant huit jours au moins avant l'expérimentation :

— foin de luzerne,

— foin de luzerne + peptones,

— foin de luzerne + navets (aliment riche en glucides).

Un premier prélèvement est effectué à 7 heures, avant le repas; le deuxième à 9 heures, juste après le repas; les suivants à 10, 11, 12, 14, 16 et 18 heures.

Le matériel de chaque prélèvement est pesé et échantillonné; on prépare l'extrait sur lequel sera effectué le dosage des acides au pH-mètre.

Le tableau VIII et la figure 5 illustrent les résultats.

Discussion des résultats

1. *Influence du régime*

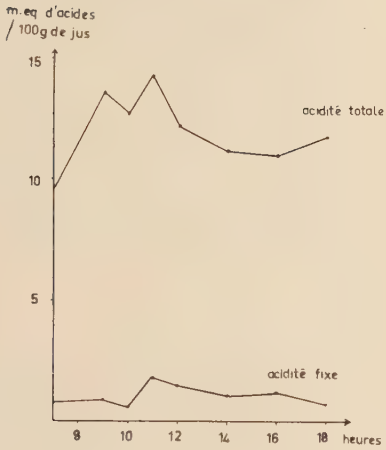
Les quantités d'acides totaux varient peu d'un régime à l'autre, tandis que celles des acides fixes sont deux à trois fois plus élevées quand le régime est riche en glucides. Si la ration contient beaucoup de protides, la quantité d'acides non volatils est légèrement plus élevée que si l'animal consomme du foin de luzerne seul.

2. *Influence du repas*

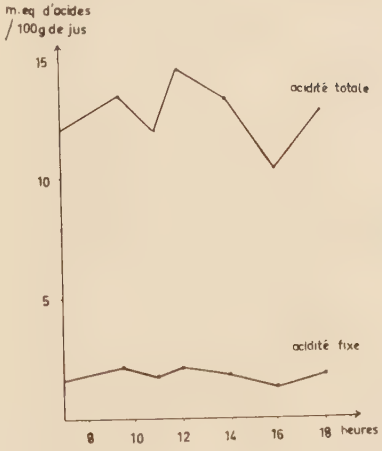
Avec le *foin de luzerne,* l'acidité totale augmente peu et de façon irrégulière après le repas. L'acidité fixe reste assez basse et varie de 0,75 à 1,80 milli-équivalents. Ceci s'explique par la rapidité de la transformation des acides intermédiaires en acides volatils (voir la série de chromatogrammes, fig. 6 et 7).

FIG. 5

Variations de l'acidité totale
et de l'acidité fixe après un repas



a) de foin de luzerne



b) de foin de luzerne
et de peptones

c) de foin de luzerne et de navets

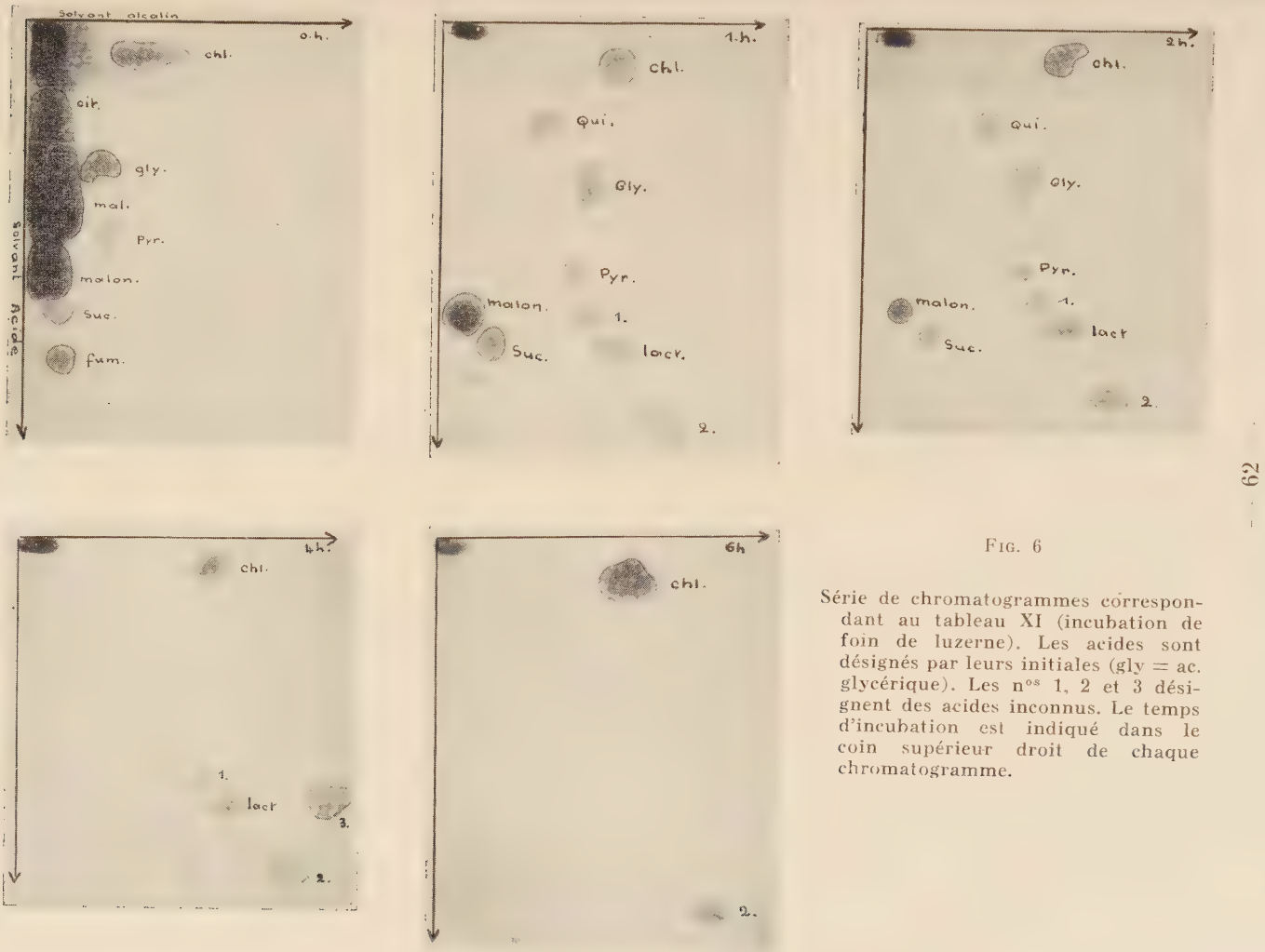


FIG. 6

Série de chromatogrammes correspondant au tableau XI (incubation de foin de luzerne). Les acides sont désignés par leurs initiales (gly = ac. glycérique). Les nos 1, 2 et 3 désignent des acides inconnus. Le temps d'incubation est indiqué dans le coin supérieur droit de chaque chromatogramme.

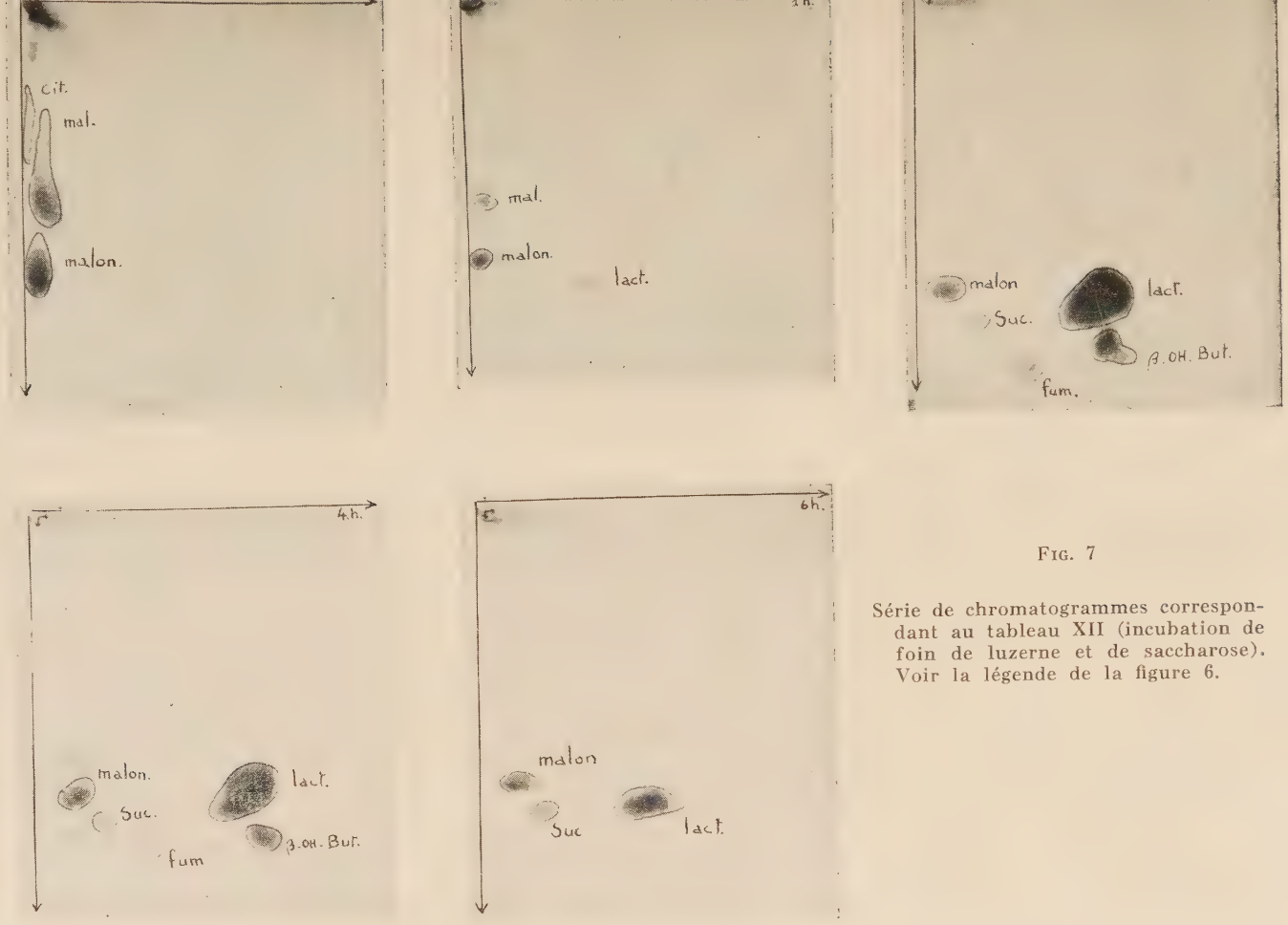


FIG. 7

Série de chromatogrammes correspondant au tableau XII (incubation de foin de luzerne et de saccharose). Voir la légende de la figure 6.

Avec *une ration riche en glucides,* il y a une augmentation rapide de l'acidité totale qui suit fidèlement le clocher de l'acidité fixe. Celui-ci se situe à la deuxième heure après le repas et est dû à la formation d'acide lactique. La vitesse de formation de cet acide est plus rapide que celle de sa dégradation. Ainsi, dans la panse de notre mouton régulièrement nourri de navets, l'acide lactique est toujours présent même si l'échantillonnage se situe loin du repas. Juste avant le repas, la valeur de l'acidité fixe atteint 1,2 milli-équivalents contre 0,80 quand la ration se compose de foin seul.

Avec *une ration riche en protides,* l'acidité totale augmente en dents de scie, l'acidité fixe varie peu.

Si l'on compare les tableaux V et VIII, on constate que les quantités d'acides totaux sont environ deux fois plus élevées chez le mouton nourri normalement que chez l'animal à jeun; les acides fixes sont cinq à dix fois plus abondants, ce qui est le signe d'un métabolisme actif.

Conclusion

L'acidité fixe, qui ne représente que 4 % de l'acidité totale chez l'animal à jeun, croît après le repas, de 10 à 20 % selon la ration, puis diminue aux dépens de l'acidité volatile. Chez l'animal nourri *ad libitum,* l'acidité fixe suit de façon parallèle la cinétique de l'acidité totale, avec des variations quantitatives selon le régime.

II. MÉTABOLISME DES ACIDES NON VOLATILS DANS LA PANSE

Après avoir mis en évidence l'existence, dans le rumen, d'une quinzaine d'acides organiques non volatils, et montré leur variation quantitative selon le régime alimentaire et l'heure du prélèvement par rapport au repas, nous nous sommes posée le problème de leur origine.

A. Les acides de la plante-aliment

Les plantes dont se nourrissent ces animaux sont riches en acides organiques. Nous les avons identifiés dans un certain nombre d'aliments usuels : foin de graminées, foin de luzerne, luzerne fraîche, son, choux.

Extraction des acides et chromatographie

10 g de foin sont broyés au mortier; 50 g de luzerne fraîche et 100 g de choux sont passés au mixer avec de l'alcool. Après extraction alcoolique à chaud, filtration et évaporation à sec, on reprend chaque résidu par de l'eau distillée, on centrifuge. Le liquide surnageant est passé sur colonne de Dowex 2 qui retient les acides. L'éluat est concentré jusqu'au volume de 1 ml. L'extrait est alors prêt

TABLEAU IX

Les acides organiques de la plante aliment

FOIN DE GRAMINÉES	FOIN DE LUZERNE	LUZERNE FRAÎCHE	SON	CHOUX	
				Feuilles vertes	Feuilles blanches
Malique	Malique	Malique	Malique	Malique	Malique
Aconitique	Malonique	Malonique	Oxaloacétique	Citrique	Glycolique
Quinique	Glycérique	Citrique	Fumarique	Glycolique	Citrique
Malonique	Citrique	Glycolique	Citrique	Tartrique	Tartrique
Citrique	Quinique	Tartrique	Succinique	Oxalique	Quinique
Fumarique	Gluconique	Quinique	—	Quinique	
Oxalique	Tartrique	Succinique	Glycérique		
Glycolique	Oxalique	Fumarique	Quinique		
Glycérique	Succinique		Tartrique		
	Fumarique		Gluconique		
	Glycolique		Lactique		
	Lactique				

Ces acides ont été identifiés par chromatographie. Ils sont classés par ordre d'importance décroissante.

pour la chromatographie. Les dépôts sont faits avec 5 μl pour les foins et la luzerne fraîche, avec 10 μl pour le son et les choux.

Résultats

Ils sont exprimés dans le tableau IX.

Ces acides ont été identifiés par chromatographie. Ils sont classés par ordre d'importance décroissante.

Discussion

Parmi les quinze acides mis en évidence, on constate que les acides malique, malonique, citrique et glycérique prédominent dans les différents aliments analysés. L'acide malonique est absent du son. Les acides quinique, tartrique, oxalique, succinique, fumarique, glycérique sont presque toujours présents. L'acide gluconique et l'acide lactique, qui existent en petites quantités dans la luzerne sèche et le son, doivent provenir de la fermentation des sucres au cours du séchage.

On doit donc se demander si les acides reconnus dans la panse ne proviennent pas directement des végétaux ingérés. Mais il est également possible d'envisager pour ces substances une autre origine: l'activité métabolique des bactéries de la panse pourrait se traduire par une libération d'acides fixes puisque l'on connaît bien celle des acides volatils.

B. Les acides organiques fixes

formés à partir des constituants de la plante-aliment

C'est précisément cette activité métabolique éventuelle des bactéries, sur les composés de la ration, que nous avons soumise à l'expérience.

Une première observation nous a montré que les acides organiques trouvés dans la panse ne résultaient pas d'une simple dissolution des acides de la plante qui seraient libérés lors de l'attaque de la fibre végétale par les bactéries. Nous avons comparé les acides de la paille de blé avec les acides d'ingesta totaux de rumen contenant cette même paille. Dans les deux cas, les extractions ont été faites comme pour le matériel végétal. L'analyse des acides a été effectuée par chromatographie sur papier. La quantité déposée au point de départ du chromatogramme est dix fois plus élevée pour l'extrait de plante du rumen que pour la paille.

Le tableau X n'a donc pas une valeur quantitative.

TABLEAU X

ACIDES DE LA PAILLE DE BLÉ	ACIDES TROUVÉS DANS LA PAILLE APRÈS SÉJOUR DANS LE RUMEN
Oxalique	Succinique
Quinique	Malique
Glycérique	Glycolique
Glycolique	Fumarique
Malique	Quinique
Malonique	Lactique
Fumarique	Adipique
	Malonique
	Glycérique
	Aromatiques

Après séjour de la paille dans le rumen, on constate d'une part que le nombre d'acides s'est accru, d'autre part que la concentration relative des acides initialement présents a totalement changé; il n'y a plus trace d'acide oxalique; les acides malonique et glycérique sont également en voie de disparition; par contre, les acides succinique, malique et fumarique passent en tête de liste; puis apparaissent les acides lactique, adipique et un ou deux aromatiques.

Cependant, au point de vue quantitatif, bien que la plante contienne un plus petit nombre d'acides, son acidité totale est environ dix fois plus grande que celle du contenu du rumen.

Il y a donc, dans la panse, des évolutions qualitative et quantitative de l'acidité organique dues à l'intervention de la microflore. C'est cette activité bactérienne que nous allons maintenant examiner de façon plus systématique.

Protocole expérimental

Nous opérons sur le jus de rumen de bovins sacrifiés à l'abattoir. Une série d'Erlenmeyers contenant 100 ml de ce liquide est mise à incuber au bain-marie à 39°C en présence de différents aliments.

Ces substrats sont :

a) *Le foin de luzerne* : finement pulvérisé (5 g) ;

b) *Un aliment riche en sucre* : foin de luzerne pulvérisé (5 g) + saccharose (1 g) ;

c) *Un aliment riche en protéines* : solution de peptones au taux final de 0,5 %.

Les prélèvements sont faits au cours des diverses incubations à 1, 2, 4, 6 et parfois 24 heures.

d) *Des substances pures :*

acide citrique	10 mM
acide malique	10 mM
acide fumarique	10 mM
acide lactique	20 mM

Les prélèvements sont faits après 1/2, 1, 2, 4 et 6 heures d'incubation.

1° *Préparation des échantillons pour l'analyse chromatographique*

Pour l'extraction et la purification des acides on se reportera au chapitre des techniques.

L'échantillon soumis à la chromatographie est concentré cent fois par rapport au milieu d'incubation, c'est-à-dire que l'éluat sec est repris par 1 ml d'eau. Les dépôts sont faits avec 10 µl dans le premier et le troisième cas et avec 5 µl dans le cas de la surcharge en sucre. Chaque dépôt représente donc les 1/100 ou le 1/200 du liquide d'incubation.

2° *Préparation des échantillons témoins (temps 0)*

a) *Foin de luzerne :*

Cet échantillon est destiné à identifier les acides de l'aliment végétal qui diffusent dans le milieu. Dans ce but, nous faisons incuber six heures à 39°C, 5 g de foin de luzerne pulvérisé dans 100 ml d'eau distillée. Les acides de la plante passent en solution pratiquement au bout d'une heure. On filtre pour enlever les débris végétaux et on fixe les acides du filtrat sur colonne échangeuse d'anions. Sur cette même colonne on fait passer l'extrait alcoolique contenant les acides de 100 ml de jus de rumen.

b) *Solution de peptones :*

0,5 g de peptones sont dissous dans 100 ml d'eau et passés sur colonne en même temps que 100 ml de jus de rumen.

c) *Surcharges en substances pures :*

Les acides étudiés sont ajoutés aux extraits alcooliques du jus de rumen avant le passage sur colonnes.

d) *Jus de rumen :*

100 ml de jus de rumen ont été soumis plusieurs fois aux mêmes conditions expérimentales. A la concentration relativement modeste (1/200) la liqueur de la panse issue d'animaux à jeun ne laisse apparaître, et de manière inconstante, que des traces d'acides glycolique, lactique, pyrrolidone-carboxylique et succinique. Tous les acides de l'échantillon témoin viennent donc de l'aliment incubé.

Résultats

Les tableaux XI, XII, XIII et XIV et les figures 6 et 7 montrent que les acides organiques fixes ont une vie éphémère dans la panse (quelques heures) qu'ils proviennent des acides déjà présents dans la plante ou qu'ils résultent du métabolisme des glucides et protides de l'aliment.

C. Dégradation des acides organiques fixes en acides volatils

Les acides organiques fixes sont des produits du métabolisme intermédiaire. Ils sont généralement transformés en acides volatils et en gaz par les microorganismes de la panse. Nous avons étudié ces transformations pour quelques-uns d'entre eux : acides citrique, fumarique, lactique, malique, malonique, oxalique, pyrrolidone-carboxylique, succinique, tartrique (fig. 8). Les produits terminaux de la plupart de ces acides ont été mis en évidence. Nous avons simplement vérifié si nos résultats étaient conformes à ceux trouvés par les auteurs. Mais, à notre connaissance, la dégradation des acides citrique, pyrrolidone-carboxylique et tartrique par les bactéries du rumen n'a encore jamais été étudiée.

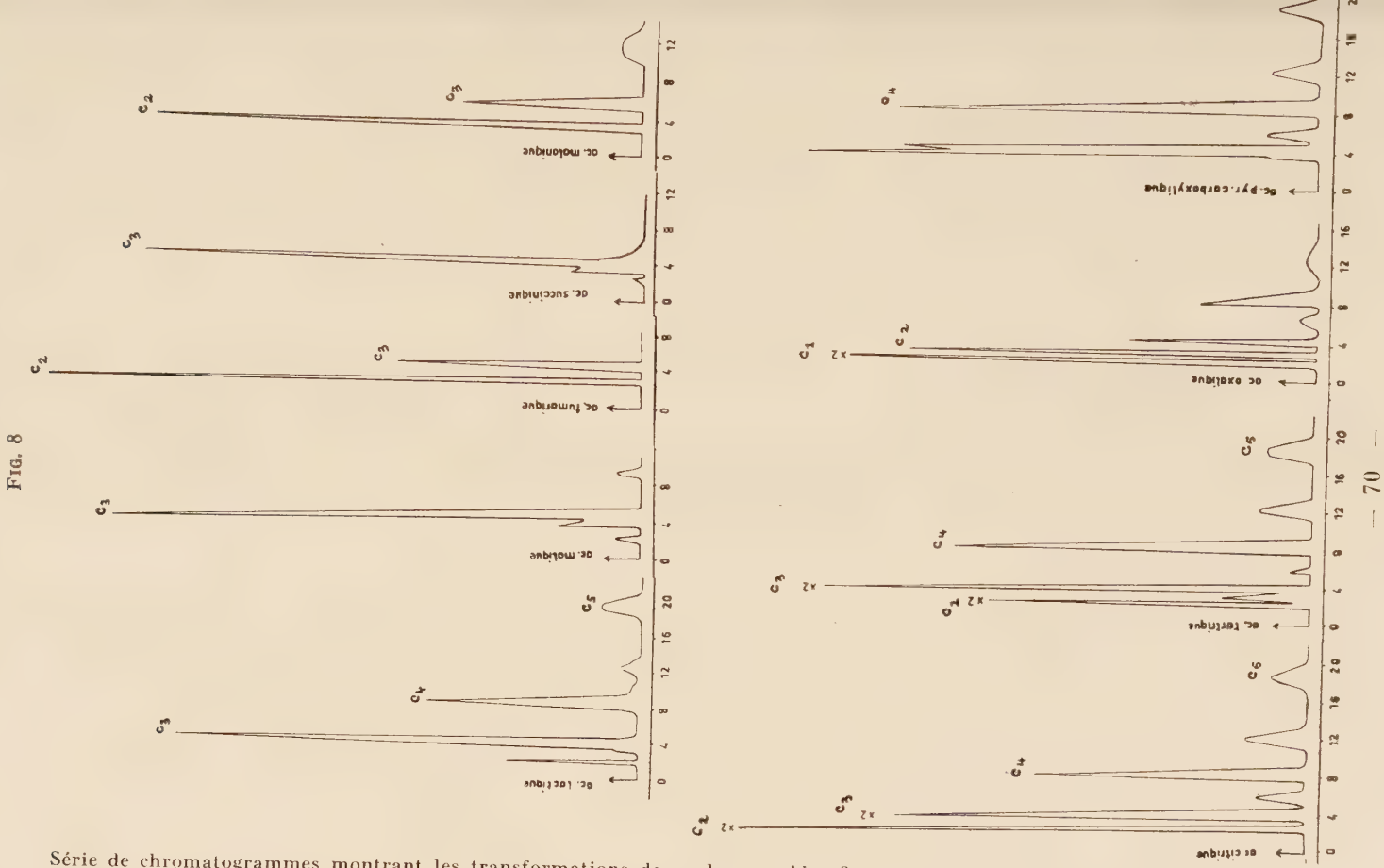


Fig. 8

Série de chromatogrammes montrant les transformations de quelques acides fixes en acides volatils.
Les substrats sont incubés 80 mn (les acides oxalique et pyrrolidone-carboxylique 3 h) en présence de suspensions lavées de bactéries du rumen. Après leur transformation en esters méthyliques, les acides volatils sont analysés par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes : colonne de célite imprégnée de 20 % de dioctylphtalate. Température: 80°C. Débit du gaz vecteur : hélium = 3 l/h.

TABLEAU XI

Evolution des acides organiques fixes issus des constituants du régime (foin de luzerne)

INCUBATION avec foin de luzerne	MALIQUE	MALONIQUE	CITRIQUE	GLYCÉRIQUE	SUCCINIQUE	FUMARIQUE	LACTIQUE	PYRROLIDONE carboxylique	ACIDES inconnus 1	2	3
Durée											
0 h.	++++	+++	++	+++	+	+		±	—	—	—
1 h.	±	++	—	+	++	—	+	+	+	+	—
2 h.	—	+	—	±	±	—	±	±	±	+	—
4 h.	—	—	—	—	—	—	±	—	±	+	++
6 h.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—

Légende des tableaux XI, XII, XIII et XIV.

Les signes suivants indiquent des quantités décroissantes d'acide :

++++, +++, ++, ±

Le signe — : pas de tache.

Acides inconnus :

1. Rg { Alc. : 120 / Ac. : 116 }

2. Rg { Alc. : 210 / Ac. : 160 }

3. Rg { Alc. : 190 / Ac. : 120 }

$$Rg = \frac{\text{distance de migration de l'acide glycolique}}{\text{distance de migration de la tache}} \times 100$$

TABLEAU XII

Evolution des acides organiques fixes issus des constituants du régime (foin de luzerne + sucre)

INCUBATION AVEC FOIN DE LUZERNE ET SUCRE	MALIQUE	MALONIQUE	CITRIQUE	SUCCINIQUE	FUMARIQUE	LACTIQUE	β-HYDROXY-BUTYRIQUE
0 h.	++	++	+	—	—	—	—
1 h.	+	+	—	—	—	±	—
2 h.	—	+	—	+	+	++++	++
4 h.	—	+	—	+	±	+++	+
6 h.	—	+	—	+	—	+	—
24 h.	—	—	—	—	—	—	—

TABLEAU XIII

Evolution des acides organiques fixes issus des constituants du régime (peptones)

INCUBATION AVEC PEPTONES	PYRROLIDONE CARBOXYLIQUE	SUCCINIQUE	FUMARIQUE	MALIQUE
0 h.	++	—	—	—
1 h.	++	—	—	—
2 h.	+++	±	+	±
4 h.	++++	—	—	.
6 h.	++	—	—	—
24 h.	—	—	—	—

Mode opératoire

Des suspensions lavées de bactéries de rumen de mouton sont distribuées dans des fioles de Warburg à deux tubulures et dans de grosses fioles de 50 ml adaptables aux manomètres. Les acides sont ajoutés dans chaque fiole à la concentration de 20 μmoles pour 2 ml de suspension bactérienne. Les gaz formés à partir de ces acides seront mis en évidence et dosés dans l'appareil de Warburg. Les liqueurs d'incubation des grosses fioles serviront à séparer et à identifier par chromatographie en phase gazeuse les différents acides volatils formés.

Cette technique a l'avantage de mettre fioles de Warburg et fioles d'incubation dans les mêmes conditions : de température (38°C), d'atmosphère (les expériences sont faites sous N_2), d'agitation, de durée d'expérimentation (80 mn).

Résultats

Les valeurs obtenues, gaz dégagés et acides volatils formés à partir de 10 millimoles de substrat, figurent sur le tableau XV.

Discussion

Les acides organiques fixes, qu'ils résultent du métabolisme des glucides et protides de l'aliment, ou des acides préformés dans la plante sont en général vite dégradés par les bactéries. L'acide pyrrolidone-carboxylique est le plus long à disparaître.

Examinons le sort des divers acides dans les expériences des tableaux X à XV.

a) *L'acide citrique*

C'est celui qui disparaît le plus rapidement; on n'en trouve plus aucune trace au bout d'une heure dans les conditions normales. Nous n'avons jamais pu en déceler dans la panse de bovins sacrifiés à l'abattoir même en chromatographiant des extraits très concentrés de la liqueur.

Nous avons alors fait incuber de l'acide citrique pur avec du jus de rumen pour essayer de saisir les étapes intermédiaires de son métabolisme.

A la concentration de 10 millimoles il disparaît à la quatrième heure d'incubation et aucun autre acide fixe n'apparaît sur nos chromatogrammes, mais l'acidité volatile augmente notablement (tableau XIV).

TABLEAU XIV

Evolution des acides organiques fixes issus des constituants du régime

DURÉE D'INCUBATION	SUBSTRAT Acide citrique	SUBSTRAT Acide malique			SUBSTRAT Acide citrique
	Acide citrique présent	Acide malique présent	Acide succinique présent	Acide fumarique présent	Acide citrique présent
0 h.	++++	++++	–	—	++++
1/2 h.	+++	+++	++	++	+++
1 h.	++	++	+	+	++
2 h.	+	+	+	—	+±
4 h.	±	—	—	—	+
6 h.	—	—	–	—	±
Acidité fixe au temps 0	30	20			20
Augmentation de l'acidité volatile à 6 h	16,4	10,8			13,5

L'acidité volatile est exprimée en m.Eq. d'acide acétique.

Pour rendre compte de ces faits et établir le mode de dégradation de cet acide, nous avons mis en évidence et dosé les acides volatils et les gaz formés au cours d'incubations *in vitro* à l'aide de suspensions lavées de bactéries de rumen. Les résultats, exprimés dans le tableau XV, permettent d'admettre qu'une partie importante de l'acide citrique est transformée en acide acétique, CO_2 et CH_4 selon la réaction suivante :

$$10\ COOH - CH_2 - \underset{\displaystyle OH}{\overset{\displaystyle COOH}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}} - CH_2 - COOH \xrightarrow{+\ 10\ H_2O}$$

$$20\ CH_3COOH + 10\ CO_2 + 10\ H - COOH$$

$$\downarrow$$

$$2{,}5\ CH_4 + 7{,}5\ CO_2 + 5\ H_2O\ (1)$$

$$\text{Bilan} \longrightarrow 20\ CH_3COOH + 17{,}5\ CO_2 + 2{,}5\ CH_4 + 5\ H_2O.$$

Nos résultats expérimentaux sont en parfait accord avec cette équation. Cependant, à côté de l'acide acétique, nous trouvons de l'acide propionique. La formation d'acide propionique peut s'expliquer par le processus fermentatif décrit par Deffner et Frank (1939) chez *Aerobacter aerogenes* :

4 citrate ⟶ 7 acétate + 6 CO_2 + formiate + propionate.

Une citratase ou citrate desmolase a été mise en évidence chez *Streptococcus faecalis*, *Aerobacter aerogenes* et *Escherichia coli*, trois germes que nous avons isolés du rumen de mouton, et qui scindent le citrate en oxaloacétate et acétate. L'oxaloacétate peut être décarboxylé en pyruvate qui donne de l'acétate et du formiate ou être dégradé selon le schéma de Johns (voir le paragraphe concernant l'acide lactique) jusqu'au propionate. Cette seconde hypothèse semble peu

---

(1) *Methanobacterium formicicum* et *Methanobacterium ruminantium* isolés par Hungate et coll. attaquent les substrats suivants : formiate, CO_2, H_2 [Mylroie et Hungate, (1954) ; Smith (1941)]. Leur spécificité est si étroite qu'ils ne peuvent vivre qu'en association avec d'autres espèces qui leur fournissent ces substrats à partir de molécules plus compliquées.

Le premier, Van Niel, a émis l'hypothèse que l'oxydation du substrat était couplée avec la réduction du CO_2 en CH_4.

$$4\ H\ COOH \longrightarrow 4\ H_2 + 4\ CO_2$$
$$4\ H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2\ H_2O$$

Les observations de nombreux auteurs dont celles de Mc Neill et coll. (1955), concernant les bactéries du rumen, ont par la suite confirmé cette théorie.

probable, car nous n'avons pas décelé d'intermédiaires tels que malate, fumarate, succinate.

b) *L'acide tartrique*

Les produits de dégradation de cet acide sont les mêmes que ceux de l'acide citrique. L'acide tartrique semble, en effet dégradé en oxaloacétate. Shilo (1957) a mis en évidence cet intermédiaire du métabolisme chez *Pseudomonas* en bloquant sa décarboxylation en pyruvate par l'EDTA. Or les bactéries du rumen peuvent dégrader l'oxaloacétate selon trois voies différentes qui rendent compte des métabolites terminaux que nous avons trouvés.

c) *L'acide lactique*

Il apparaît en quantité énorme quand l'aliment est riche en sucres. Dans nos expériences, le maximum se situe à la deuxième heure d'incubation *in vitro* et deux heures après le repas *in vivo* (fig. 7), tandis que Phillipson (1942) ainsi que Waldo et Shultz (1956) observent un clocher dès la première heure, que l'animal ingère du foin de luzerne ou du grain.

Ces auteurs ont démontré que ni l'amidon ni la cellulose ne donnaient lieu à la formation d'acide lactique. Après administration de foin, l'apparition de petites quantités d'acide lactique à la première heure peut être expliquée par la fermentation des glucides solubles contenus dans la plante.

Une surcharge en lactate augmente notablement la quantité d'acides gras volatils, mais nous n'avons pas saisi la formation d'acides fixes intermédiaires. Par contre, au cours de l'incubation avec du saccharose, le succinate accompagne le lactate (tableau XII). Or on connaît plusieurs voies métaboliques du lactate dans le rumen :

Veillonella gazogenes le transforme en propionate avec formation intermédiaire de succinate suivant le schéma proposé par Johns (1951) :

$$\text{Lactate} \longrightarrow \text{pyruvate} \xrightarrow{CO_2} \text{oxaloacétate} \longrightarrow \text{malate} \longrightarrow \text{fumarate} \longrightarrow \text{succinate} \longrightarrow \text{propionate} + CO_2.$$

Clostridium propionicum qui ne décarboxyle pas le succinate et ne fermente ni le malate ni le fumarate, réduit le lactate en propionate : par la voie de l'acrylate. Cette même voie métabolique a été retrouvée par Elsden et coll. (1951) et Lewis et Elsden (1955) avec le *microorganisme LC*

(coccus Gram négatif) qui fermente le lactate avec formation d'acétate, de propionate, de n-butyrate et de n-valérate. Des études récentes de Ladd et Walker (1959) ont montré que des extraits acellulaires de microorganismes LC fermentent le lactate et l'acrylate aux mêmes taux pour donner les mêmes métabolites terminaux :

$$3\ CH_2 = CH - COOH + 2\ H_2O \longrightarrow$$
$$2\ CH_3CH_2 - COOH + CH_3 - COOH + CO_2.$$

Une courte dialyse des extraits abolit leur activité, celle-ci est restaurée par addition d'acétyl-phosphate, d'ATP, d'ADP, ou de pyruvate.

Il est certain que bien d'autres microorganismes doivent encore intervenir dans ce métabolisme. Un substrat différent provoque un développement d'organismes spécifiques. Une véritable sélection s'accomplit. Ainsi le lactate en présence de saccharose ne sera pas métabolisé de la même façon que le lactate ajouté directement aux milieux d'incubation. Dans le premier cas, il pourrait y avoir prédominance de *Veillonella gazogenes*, tandis que dans le second cas la voie métabolique adoptée serait celle de *Clostridium propionicum* et du *Coccus LC* d'Elsden.

d) *L'acide malique*

Il disparaît assez rapidement (fig. 6 et 9). Si on ajoute

Fig. 9

Série de chromatogrammes montrant les transformations de l'acide malique par les bactéries du rumen au cours des heures d'incubation.

TABLEAU XV

Les produits terminaux du métabolisme de quelques acides fixes traités par des suspensions lavées de bactéries du rumen de mouton

SUBSTRAT 10 mMoles/1 000 ml	QUANTITÉS D'ACIDES VOLATILS EN M.EQ	CO_2 en mMoles	CH_4 en mMoles	PRINCIPAUX ACIDES VOLATIFS FORMÉS PAR ORDRE D'IMPORTANCE
Acide citrique.	22,5	17,5	2,5	Acide acétique, acide propionique, acide butyrique, acide valérique
Acide tartique.	10,8	12	—	Acide acétique, acide propionique. acide butyrique, acide valérique
Acide lactique.	9,5	7,6	—	Acide propionique, acide butyrique, acide valérique, acide acétique.
Acide malique.	13	10,5	0,6	Acide propionique
Acide fumarique.	11,5	11	—	Acide acétique, acide propionique
Acide succinique.	11,8	9	—	Acide propionique
Acide malonique.	3,5	3,4	—	Acide acétique
Acide oxalique.	—	3	0,5	Acide formique, acide acétique
Acide pyrrolidone-carboxylique.	2,5	1	—	Acide acétique, acide propionique, acide butyrique

Les gaz dégagés sont mesurés dans l'appareil de Warburg.

Conditions expérimentales : température : 38°C; agitation : 70 coups-minute; atmosphère : azote rectifié. Durée de l'expérimentation : 80 minutes.

Les acides volatils formés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse.

cet acide en surcharge au taux de 10 mM, on observe sa disparition progressive au cours des deux premières heures d'incubation et l'apparition simultanée des acides succinique et fumarique (fig. 9) ; ces étapes peuvent s'intégrer dans le schéma de JOHNS :

Malate ——→ fumarate ——→ succinate ——→ propionate.

De plus, le malate ajouté augmente la proportion d'acides volatils formés (tableaux XIV et XV).

e) *L'acide fumarique*

Dans le cas de la luzerne incubée seule, il disparaît très vite. Si le milieu est enrichi en saccharose, il apparaît en petite quantité à la deuxième heure en même temps que l'acide succinique (fig. 7). Il en est de même lors d'une surcharge en malate (fig. 9). Si le milieu est riche en protides, il s'en forme un peu à la deuxième heure. Il pourrait alors provenir de la désamination de l'acide aspartique grâce à l'aspartase de WOOLF (1929).

Nous avons montré que les produits terminaux de son catabolisme sont surtout l'acide acétique et le gaz carbonique. On s'attendait à trouver principalement de l'acide propionique, l'acide fumarique étant un des maillons du schéma de JOHNS. Dans nos expériences l'acide fumarique est donc dégradé par la voie de l'oxaloacétate et du pyruvate.

f) *L'acide succinique*

C'est un acide intermédiaire important dans les fermentations bactériennes de la panse. En présence de foin de luzerne, il apparaît pendant les deux premières heures d'incubation. Il semble alors provenir de la métabolisation de l'acide malique qui est très abondant dans la plante (fig. 6). En effet, une surcharge en malate provoque une apparition de succinate (fig. 9). En présence d'une quantité importante de sucre, l'acide succinique apparaît parallèlement à l'acide lactique. Or, suivant le schéma de JOHNS, *Veillonella gazogenes* et *Propionibacterium pentosaceum* transforment le lactate en propionate avec formation intermédiaire de succinate.

D'autre part, l'acide succinique est une étape importante de la dégradation de la cellulose par deux bactéries isolées en culture pure à partir du rumen de mouton et de bœuf :

Ruminococcus flavefaciens (SIJPESTEIJN, 1951),

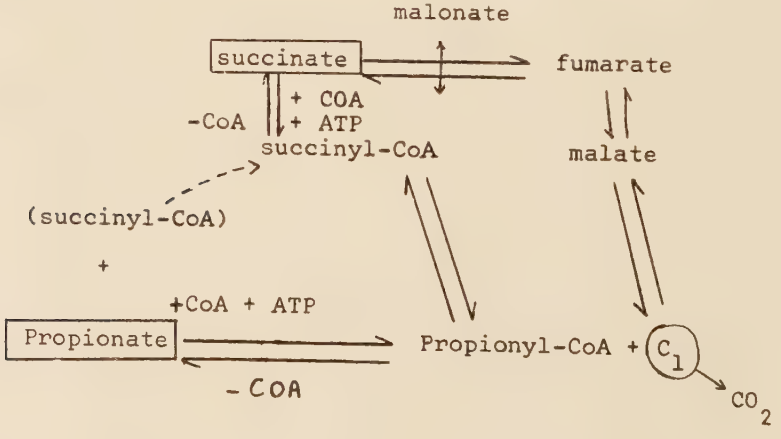
Bacteroïdes succinogenes (HUNGATE, 1950).

Mais, dans nos exemples, l'apparition de cet acide est

fugace, les quantités mises en jeu sont faibles. Il semble donc que la transformation invoquée par les auteurs précités soit négligeable dans nos conditions expérimentales. Au reste, Marston (1948) n'en trouve que de faibles quantités durant la fermentation de la cellulose dans un rumen artificiel. Sijpesteijn et Elsden (1952), qui étudient la production d'acide succinique dans le rumen après un repas normal (paille d'avoine, foin de prairie et flocons de maïs), trouvent une pointe maximum de 3,63 millimoles après 150 minutes et une chute rapide : 0,66 millimole après 250 minutes.

Ces derniers auteurs ont démontré que cet acide était rapidement décarboxylé en acide propionique volatil. Mais c'est Johns (1951) qui, le premier, mit en évidence la décarboxylation de l'acide succinique en acide propionique à l'aide de suspensions lavées d'une culture pure de *Veillonella gazogenes* isolée du rumen de mouton. Nos résultats concordent avec ceux de ces auteurs (fig. 8) ; nous trouvons des quantités équimoléculaires d'acide propionique et de gaz carbonique (tableau XV).

Le mécanisme intime de cette décarboxylation a été démontré par Phares, Delwiche et Carson (1956). La décomposition anaérobie du succinate en propionate et CO_2 demande du CoA et de l'ATP; ces auteurs indiquent que le CO_2 libre n'est pas produit directement, mais qu'un « CO_2 complexe », d'une structure non identifiée, est formé comme un intermédiaire transitoire. Le malonate bloque la conversion directe du succinate en malate par la voie du fumarate.



g) *L'acide malonique*

Très abondant dans la luzerne, il disparaît assez lentement, il est encore visible à la deuxième heure dans la première série d'expériences (fig. 6) et à la sixième heure dans la deuxième série (fig. 7). D'après nos expériences, tout comme dans celles de Hershberger et coll. (1956), il est métabolisé en acide acétique (tableau XV et fig. 8).

h) *L'acide oxalique*

Qu'il soit sous forme de sel de Na ou de NH_4, il est lentement attaqué par les suspensions lavées de bactéries. Or Watts (1957) constate que si l'on administre de l'oxalate à un mouton pendant trois à six jours, les bactéries issues de son rumen décomposent beaucoup plus facilement l'oxalate qu'auparavant. D'après nos résultats au Warburg, il doit être transformé en acide formique, acide acétique, CO_2 et CH_4.

i) *L'acide pyrrolidone-carboxylique*

On admet habituellement que c'est un métabolite issu de l'acide glutamique ou de la glutamine. Nous l'avons identifié sur les chromatogrammes par la méthode de détection des peptides de Rydon et Smith adaptée par Ellfolk et Synge (1955).

D'autre part, l'acide pyrrolidone-carboxylique et l'acide glycolique ont le même Rf avec les deux solvants utilisés pour nos chromatogrammes. Or nous avons rencontré l'acide pyrrolidone-carboxylique dans les peptones en quantité notable et montré l'accroissement de cette tache au cours de l'incubation (tableau XIII). Cette tache a été éluée et chromatographiée dans le solvant de Stark, Goodban et Owens (1951) (phénol/eau/HCOOH 3:1:1) qui sépare l'acide pyrrolidone-carboxylique de l'acide glycolique, en présence de ce dernier acide comme référence. Or, nous n'avons obtenu qu'une tache d'acide pyrrolidone-carboxylique, ce qui permet de conclure à sa formation par les bactéries de la panse.

Cet acide est à son tour métabolisé par les bactéries, à la différence de ce que l'on observe chez les Mammifères. Cependant, il est assez long à disparaître dans des cultures *in vitro*. Nous y reviendrons dans le chapitre consacré au catabolisme de quelques composés à noyau pyrrolidine par les bactéries du rumen de bovins.

III. CONCLUSION

Conséquences physiologiques

L'acidité organique fixe du contenu de rumen, bien que faible par rapport à l'acidité totale, n'est cependant pas à négliger :

— *du point de vue de l'analyse qualitative,* quinze acides ont été mis en évidence;

— *du point de vue quantitatif,* l'acidité fixe ne représente que 4 % de l'acidité totale chez l'animal à jeun (ingesta d'animaux d'abattoir) ; elle croît après le repas, 10 à 20 % selon la ration, puis diminue aux dépens de l'acidité volatile.

Il ne faut pas oublier que la plupart de ces acides se trouvent préformés dans les plantes ingérées par l'animal et peuvent donc être libérés dans la panse lors des fermentations.

Mais nos résultats expérimentaux permettent d'affirmer que les acides organiques fixes trouvés dans la panse ne sont pas le résultat d'un phénomène passif de dissolution des acides de l'aliment dans la liqueur du rumen. Les acides préformés dans la plante, dès qu'ils sont libérés, sont métabolisés par les bactéries en acides volatils avec parfois formation intermédiaire d'autres acides fixes :

C'est ainsi que *l'acide citrique* est transformé directement en acides volatils, tandis que *l'acide malique* passe par les intermédiaires fumarate et succinate. Il en est de même pour les acides fixes qui prennent naissance à partir des *glucides* :

glucose, saccharose ——→ acide lactique

cellulose ——→ acide succinique

et à partir des *protides* :

— soit par cyclisation d'acides aminés :

acide glutamique, glutamine ——→ acide pyrrolidone-carboxylique;

— soit par désamination d'acides aminés :

aspartate ——→ succinate (Sirotnak et coll., 1954),

——→ fumarate (van den Hande et coll., 1959),

phénylalanine ——→ acide phénylacétique (Lacoste et coll., 1958).

Il nous est évidemment difficile de discerner la part exacte qui revient à la plante de celle qui revient au métabolisme

bactérien. De toutes façons, l'aliment, qu'il arrive au stade compliqué de glucides, protides, lipides, ou à un stade déjà dégradé (acides organiques, par exemple), est repris par les enzymes des bactéries, dont presque tous les processus métaboliques convergent vers la production d'acides gras volatils à courte chaîne.

Produits terminaux du métabolisme bactérien, quel est l'intérêt physiologique de ces acides ?

Nous nous placerons au double point de vue de la prolifération bactérienne et de la physiologie de l'animal.

Rôle dans la prolifération des bactéries

Toujours abondants dans la panse, ces acides maintiennent un pH favorable à la prolifération bactérienne et aux réactions enzymatiques.

De plus, certains d'entre eux favorisent la digestion de la cellulose (Dehority et coll., 1957, 1958; Johnson et coll., 1956). Ce sont, en effet, des facteurs de croissance indispensables pour certaines bactéries (Wegner et Foster, 1960) et, en particulier, pour les bactéries cellulolytiques : *Bacteroïdes succinogenes* a besoin pour sa croissance *in vitro* d'un acide gras à chaîne ramifiée (isobutyrique, isovalérique ou α-méthyl butyrique) et d'un acide gras à chaîne droite (valérique ou caproïque) (Bryant et Doetsch, 1955). La croissance de *Ruminococcus flavefaciens* et de *Ruminococcus albus*, bactéries cellulolytiques les plus actives et les plus nombreuses du rumen, nécessite la présence de mélanges d'acides volatils, et, en particulier, des acides acétique, isovalérique, isobutyrique (Allison et coll., 1958).

Rôle dans la nutrition de l'hôte

L'hôte animal retire de ces acides un bénéfice beaucoup plus grand que les bactéries. C'est là que se manifeste d'une façon particulièrement spectaculaire la symbiose animal-microorganismes. En effet, les acides volatils n'ont pas le temps de s'accumuler dans le rumen, car ils sont absorbés par la paroi de cet organe (Phillipson et Mc Anally, 1942; Barcroft et coll., 1944; Holter et coll., 1959). Une fois passés dans la circulation générale, ces acides vont être repris dans le métabolisme de l'animal. L'importance de ces composés apparaît si l'on remarque que la *glycémie* des Ruminants est nettement inférieure à celle des autres Mammifères: 40 à 60 mg/100 ml chez la vache, 40 à 65 mg

chez le mouton d'après Dukes (1947) ; que *la teneur en acides gras volatils* est très élevée dans le sang : 6,3 à 12,5 mg chez la vache (Mc Clymont, 1951 a), 6,1 à 11 mg chez le mouton (Reid, 1950 a), par contre seulement 1,8 mg/100 ml chez l'homme et le chien selon Mc Clendon. On sait depuis longtemps que ces acides volatils servent d'aliment énergétique au Ruminant, tout comme chez le non-Ruminant l'énergie provient des composés glucidiques en C_6. Phillipson (1947) estime que ces acides peuvent suppléer pour 40 % aux besoins énergétiques de l'animal à jeun. Bien d'autres auteurs, dont Marston (1948), Carroll et Hungate (1954), Schambye (1955), ont confirmé cette contribution énergétique.

Dans une série de recherches, Armstrong et ses collaborateurs ont étudié l'utilisation énergétique des acides volatils administrés seuls, ou en mélange chez le mouton à jeun ou à l'embouche. Ils montrent que l'extra-chaleur est élevée quand ces acides sont donnés individuellement, mais qu'elle diminue considérablement quand ces acides sont donnés en mélange. Chez l'animal dont la nourriture assure le métabolisme de base, la totalité des glucides absorbés sous forme d'acides volatils provoque une extra-chaleur assez faible. Elle est cependant plus élevée que celle observée chez l'homme recevant une quantité comparable de glucides, puisque l'extra-chaleur est de 15 % chez le mouton, tandis que chez l'homme elle n'est que de 8 %.

De même que ces acides sont des aliments énergétiques utilisés directement, de même ils peuvent être des précurseurs de glucides. Reid (1950 c) affirme que l'acide propionique est la principale source de glucose chez le mouton et Mc Clymont (1951 a) suggère que tous les Ruminants maintiennent leur glycémie par néoglycogénèse à partir de cet acide. Clark et Malan (1956) montrent que l'introduction de propionate dans le rumen du mouton provoque une augmentation notable de la glycémie. Ce rôle revêt une importance capitale chez le Ruminant, dont la source de glucides solubles est plutôt limitée du fait de la nature du régime et du fonctionnement de l'appareil digestif. Les données concernant les acides acétique et butyrique sont moins précises et même contradictoires.

Enfin on n'oubliera pas l'importance de l'acide acétique dans la synthèse des lipides du lait ; 40 à 80 % de l'acide acétique passé dans le sang peuvent être repris par la glande mammaire. Ce rôle de l'acide acétique a été d'abord suggéré

par les études *in vivo* de Graham et coll. (1938), de Reineke et coll. (1941) et par le travail *in vitro* de Folley et French (1949).

Kleiber et coll. (1952, 1953, 1954) injectent des acides gras marqués dans la veine jugulaire de vaches en lactation et étudient la répartition du ^{14}C parmi les divers constituants du lait. Leurs résultats montrent que la radioactivité de l'acide acétique est surtout retrouvée dans les lipides du lait, tandis que le propionate et le butyrate jouent un rôle plus important dans la synthèse du lactose et dans celle de la caséine pour le butyrate.

Si les acides fixes aliphatiques sont rapidement métabolisés par les bactéries, il n'en est pas de même des acides aromatiques, qui sont des produits terminaux du métabolisme tant bactérien qu'animal. En effet, ce sont des produits de déchet, retrouvés dans l'urine. L'indoxyle a été dosé dans l'urine de 78 bovins par Spisni et Cappa (1954) : ils trouvent des valeurs qui varient de 0,01 à 0,3 g par 100 ml. Après injection de phényl-acétate, de la phényl-acétyl-glycine est retrouvée dans les urines du mouton, du cheval, du lapin, du chat et du chien. Seul, l'homme élimine cet acide sous forme de phényl-acétyl-glutamine (*in* Meister). Cependant l'acide phényl-propionique n'a jamais été décelé dans l'urine du Ruminant (Scott et coll., 1963).

Seul, l'acide p-amino-benzoïque est, parmi les acides aromatiques que nous avons mis en évidence, un facteur de croissance bien connu.

De toute façon, ces acides représentent dans la panse une quantité infime de l'acidité totale; nous n'avons pu les mettre nettement en évidence qu'en déterminant des surcharges en acides aminés précurseurs.

En conclusion, lorsque l'on examine le sort des produits terminaux du métabolisme bactérien, on constate que l'animal les utilise dans une très grande mesure et avec le plus grand profit tant du point de vue énergétique que plastique. Le Ruminant serait véritablement adapté à utiliser les acides gras produits par la microflore qu'il abrite. Ainsi se trouve réalisée une symbiose authentique dont il est facile de concevoir l'intérêt biologique en même temps que l'importance économique.

DEUXIÈME PARTIE

Les Acides Aminés Cycliques dans la Panse

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, une partie des acides organiques, dans la panse, a une origine protidique. En effet, la protéolyse alimentaire passe par le stade acides aminés. La présence d'acides aminés libres dans le rumen a été mise en évidence par Lewis (1955) et par Blaizot et Raynaud (1957). Et bien qu'ils semblent être peu absorbés par la paroi du rumen (Tsuda, 1956), ils y sont toujours peu abondants; la concentration en acide glutamique, acide le plus important, atteint en moyenne 1 mg pour 100 g de matière fraîche. Ceci résulte d'une dégradation rapide surtout par les microorganismes. Après nous être intéressée à l'origine des acides aliphatiques non volatils il était logique de rechercher l'origine des acides aromatiques parmi les catabolites des acides aminés cycliques. Les investigations détaillées sur le métabolisme des acides aminés dans la panse sont relativement récentes. Et si l'utilisation et la dégradation des acides aminés aliphatiques commencent à être assez bien connues, il n'en est pas de même en ce qui concerne les acides aminés cycliques. Les premiers sont généralement scindés en acides volatils, ammoniac et gaz carbonique par des processus de désamination et de décarboxylation. En 1952, El-Shazly faisant incuber du jus de rumen et des suspensions lavées de bactéries avec un hydrolysat de caséine, remarqua une corrélation entre le taux d'ammoniac et la concentration en acides volatils de C_2 à C_5; et, en particulier, il y a augmentation des acides à chaîne ramifiée en C_4 et en C_5 par rapport aux concentrations normalement présentes dans la liqueur de rumen. Il en conclut que ces acides proviennent de l'attaque des protéines. Annison (1954) identifie des quantités mesurables d'acides isobutyrique, isovalérique et méthyl-2-butyrique chez un animal dont le régime est riche en protides.

Sirotnak et coll. (1953), qui étudient la dégradation de 19 L-amino-acides par des suspensions lavées, concluent que seulement les acides aspartique et glutamique, la sérine, l'arginine, la cystéine et la cystine sont attaqués; il y a formation d'acide propionique à partir de l'acide aspartique

et surtout d'acide acétique à partir des autres. Lewis (1955) semble confirmer ces résultats. Mais Lewis (1961) montre que l'arginine, la lysine et l'ornithine sont transformées en acide δ-amino-valérique et qu'aux pH acides 5,5 et 6,5 la lysine et l'arginine sont respectivement décarboxylées en cadavérine et putrescine. Dehority et coll. (1958), à l'aide de substances marquées, prouvent que les microorganismes du rumen peuvent produire *in vitro* de l'acide isobutyrique par désamination et décarboxylation de la valine. Si ces réactions d'oxydo-réduction ont lieu dans le rumen, il n'y a aucune raison pour qu'un plus grand nombre d'acides aminés, en particulier aromatiques, n'y participent pas. Et pourtant on sait très peu de choses sur le métabolisme des acides aminés cycliques par les bactéries de la panse.

Quelques rares auteurs y font allusion :

— *Sur la phényl-alanine :* El-Shazly pose la question : « Est-elle fermentée ou assimilée par les microorganismes ? »

— *Sur la tyrosine :* « Elle disparaît rapidement » (El-Shazly).

— *Sur l'histidine :* Lewis (1955) montre qu'elle est décarboxylée et désaminée.

— *Sur la proline :* El-Shazly affirme : « Elle ne peut être dégradée que par réaction d'oxydo-réduction de Stickland. »

— *Sur l'hydroxyproline :* pratiquement aucune donnée.

— *Sur le tryptophane :* Spisni et Cappa (1954) mentionnent la présence de composés indoliques dans la panse des bovins sans préciser leur nature, ni leur origine.

C'est précisément ce manque d'information sur le métabolisme des acides aminés cycliques qui nous a conduite à entreprendre leur étude, d'autant plus que nous avons pu mettre en évidence des traces d'acides aromatiques dans le rumen.

Nous étudierons successivement les acides aminés aromatiques, la *L-phénylalanine* et la *L-tyrosine*, un acide aminé à noyau imidazole, la *L-histidine*, quatre composés à noyau pyrrolidine : *L-proline*, *L-hydroxyproline*, *acide L-pyrrolidone-carboxylique* et *2-pyrrolidone* et enfin un acide aminé à noyau indol, le *L-tryptophane*. A l'occasion de chacun d'eux nous donnerons quelques indications bibliographiques concernant leur dégradation par des bactéries autres que celles du rumen, ainsi que leur métabolisme par les tissus animaux lorsque cela présentera un

intérêt. Les résultats obtenus porteront sur les métabolites terminaux de ces acides aminés et sur les mécanismes et les agents effecteurs de leur dégradation.

I. ÉTUDE DU CATABOLISME DES ACIDES AMINÉS CYCLIQUES PAR LES BACTÉRIES DU RUMEN

A. Les acides aminés aromatiques

La L-PHÉNYLALANINE et la L-TYROSINE

Relativement peu d'information concerne la décomposition anaérobie de ces deux acides aminés. Cohen (1949), qui étudie la dégradation anaérobie des acides aminés, ne nous apporte aucune donnée sur la fermentation de la phénylalanine. Les anaérobies stricts ne paraissent guère la métaboliser alors que plusieurs anaérobies facultatifs la désaminent en acide phénylpyruvique (Henricksen, 1950). *Clostridium sporogenes* peut oxyder ou réduire la tyrosine, mais seulement oxyder la phénylalanine (Hoogerheide et Kocholaty, 1938). Par contre, à côté des germes anaérobies facultatifs, on connaît des germes anaérobies stricts qui dégradent la tyrosine : des cultures de *Cl. lentoputrescens* réduisent la tyrosine en acide p-hydroxyphénylpropionique (Brasch, 1909).

Janke (1930) et Rhein (1921) observent la formation de p-crésol dans des cultures de *Cl. cresologenes* et de phénol dans des cultures de *Cl. tetani* et de *Cl. pseudotetanicum*. Prevot et Saissac (1947) obtiennent respectivement phénol et p-crésol avec *Inflabilis teras* et *Cl. corallinum*. Aucun microorganisme ne s'est encore montré capable de produire à la fois phénol et p-crésol.

D'autres composés sont formés à partir de la tyrosine par *E. coli communis, Proteus vulgaris* et *Bacillus subtilis:* ce sont les acides p-hydroxyphényl-lactique, p-hydroxyphénylacrylique, p-hydroxyphénylacétique. Mais ces produits sont probablement formés par oxydation plutôt que par processus anaérobie.

De nouvelles études sont donc nécessaires pour donner une image cohérente de la décomposition anaérobie de la phénylalanine et de la tyrosine et ceci d'autant plus qu'en ce qui concerne les bactéries du rumen, nous n'avons trouvé qu'une seule référence.

En 1952, El-Shazly étudie l'attaque d'un mélange d'amino-acides provenant d'un hydrolysat de caséine par des

bactéries du rumen de mouton, incubées *in vitro* pendant trois heures à 40°C. Il constate la disparition rapide et complète de la phénylalanine et de la tyrosine, mais ne se prononce pas sur les transformations subies par ces acides aminés : « nos expériences ne nous montrent pas si ces acides aminés sont assimilés ou fermentés par les micro-organismes ».

D'autre part, les potentialités chimiques des microorganismes sont si grandes et diffèrent tellement d'une espèce à l'autre qu'il nous a paru intéressant d'étudier le métabolisme de ces deux acides aminés par la flore mixte du rumen.

Recherches personnelles

Le matériel est prélevé sur des animaux d'abattoir ou sur un mouton porteur d'une fistule du rumen. Les bactéries sont isolées par centrifugation du jus de rumen préalablement tamisé. Les bactéries d'abattoir sont incubées :

1° pendant 10 heures avec du maltose et de l'urée aux taux respectifs de 0,5 et 0,02 % dans le milieu d'incubation;

2° pendant 12 heures avec des peptones au taux de 0,5 %.

Le but de ces incubations est d'assurer aux microorganismes le bénéfice de conditions nutritives favorables et de rendre les prélèvements plus comparables d'un lot à l'autre malgré l'hétérogénéité des bovins au moment de l'abattage.

On prépare ensuite les suspensions lavées de bactéries. On fait incuber 100 ml de cette suspension en présence :

a) soit de 0,1 millimole de phénylalanine ou de tyrosine,

b) soit de 0,1 millimole de l'acide aminé et de 0,4 g de maltose,

c) soit de 0,1 millimole de l'acide aminé, de 0,4 g de maltose et de 0,02 g d'urée.

Un témoin sans acide aminé est préparé dans chaque cas.

Quelques expériences sont réalisées sous toluène au taux de 5 %. Sur les échantillons prélevés après 2, 4, 8 et 24 heures d'incubation, on recherche la quantité d'acide aminé restant, les métabolites terminaux : azote ammoniacal, acides volatils ou acides aromatiques, produits gazeux.

Résultats obtenus

L-PHÉNYLALANINE

Les résultats portent sur vingt prélèvements bactériens. Les chromatogrammes (fig. 10) montrent une nette diminution de la phénylalanine dans le milieu d'incubation. Par la

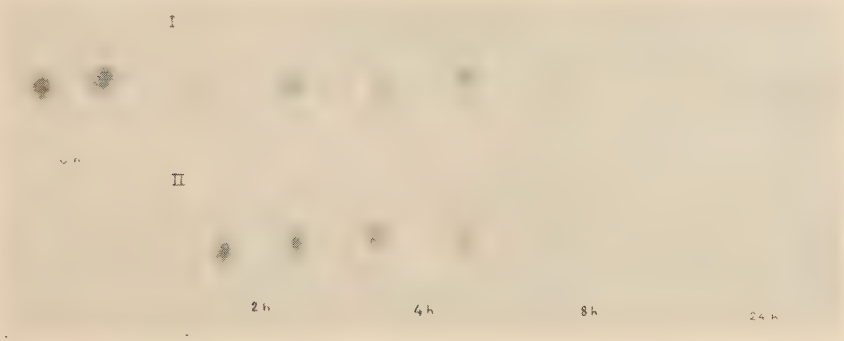


Fig. 10
Cinétique de disparition de la phénylalanine
I. Milieu avec maltose II. Milieu sans maltose

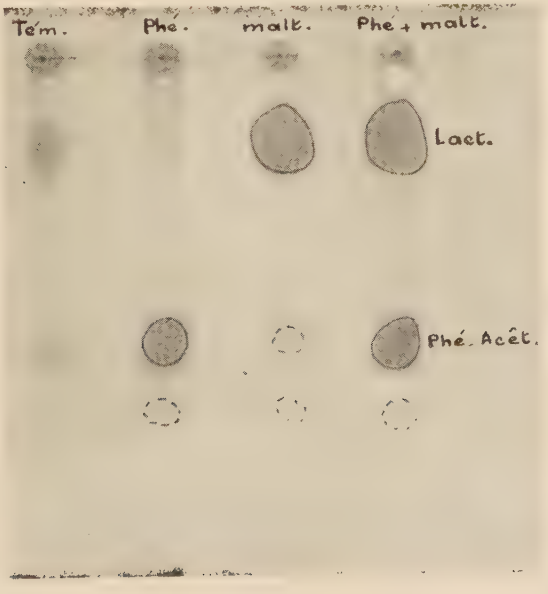


Fig. 11
Formation d'acide phénylacétique par des suspensions lavées de bactéries, à partir de la phénylalanine, avec ou sans maltose.

méthode de dosage colorimétrique de Pasieka on peut estimer cette diminution de 30 à 50 % en 8 heures et de 75 à 100 % en 24 heures.

Parallèlement il apparaît de *l'acide phényl-acétique* (fig. 11). Cet acide a été identifié d'une part par chromatographie sur papier, d'autre part à l'aide de réactions colorées: ocre-rose au nitrate d'argent ammoniacal; crème-bleuté au réactif : ferricyanure de potasium-perchlorure de fer. Nous ne sommes pas arrivée à purifier suffisamment l'acide phénylacétique élué des chromatogrammes pour en obtenir un spectre convenable au spectrographe de masse.

L'interprétation la plus simple de ces résultats est d'admettre une désamination de la phénylalanine suivie d'une décarboxylation oxydative de l'acide phényl-pyruvique; c'est-à-dire une désamination oxydative.

L'étude de cette réaction se déroulera en deux étapes :

a) Etude de la désamination;

b) Etude de la décarboxylation.

a) *Etude de la désamination.*

Le faible dégagement d'ammoniac observé lorsque l'on fait incuber un seul acide aminé en présence de bactéries de rumen est bien connu. Pour les acides aminés aromatiques, Lewis n'observait qu'un dégagement négligeable par rapport au contrôle après deux heures d'incubation. Nous savons, comme l'a démontré El-Shazly, que la décomposition des amino-acides en ammoniac et acides volatils est fortement accrue par l'augmentation des protéines solubles dans la ration. Pour toutes ces raisons, nous avons estimé qu'il pouvait être intéressant de soumettre préalablement les bactéries à un milieu nutritif riche en protéines, non seulement pour rendre les prélèvements plus homogènes d'une expérience à l'autre, mais aussi pour stimuler leur pouvoir de désamination. En augmentant le temps de l'expérimentation et en opérant dans des conditions favorables, nous avons réussi à mettre en évidence la désamination de la phénylalanine. Nous avons observé que la présence de glucides dans le milieu, en favorisant l'utilisation de l'ammoniac par les bactéries, peut masquer totalement ce phénomène.

Dans le tableau XVI on peut comparer la cinétique de disparition de la phénylalanine et la concentration de l'azote ammoniacal dans le milieu en présence ou en absence de

maltose. Ainsi, malgré la culture préalable des bactéries dans un milieu nutritif identique, on observe des variations dans la quantité d'ammoniac décelable dans le milieu d'incubation. En effet, la quantité d'ammoniac dosée à un moment donné est fonction non seulement de la vitesse de dégradation de la phénylalanine, mais aussi de l'équilibre entre la protéosynthèse et la protéolyse bactériennes. En présence de sucre, la protéosynthèse l'emporte sur la protéolyse et, après 24 heures d'incubation, la quantité d'ammoniac présente dans le milieu est négligeable. En absence de sucre, on peut observer soit une augmentation progressive d'ammoniac dans le milieu de 0 heure à 24 heures (expériences 1 et 5), soit un dégagement d'ammoniac dont le clocher se situe à 8 heures, suivi d'une diminution de cet ammoniac à 24 heures (expériences 2, 3, 4) ; cette diminution peut être d'autant plus accentuée qu'il y a de la phénylalanine dans le milieu. Ce sont alors les réserves glucidiques des bactéries qui libèrent l'énergie nécessaire à la synthèse protéique, synthèse favorisée par la phénylalanine.

b) *Etude de la décarboxylation.*

Cette étude sera faite dans un chapitre ultérieur consacré à la mesure des dégagements gazeux concernant les acides aminés cycliques. Tout en évitant les répétitions on pourra ainsi en faire une étude comparative.

Ainsi, selon l'expression de El-Shazly, *la phénylalanine est « fermentée » par les bactéries du rumen.*

Quelles sont les conditions favorables à cette fermentation ?

1. Facteurs physiques

Influences du pH et de la température

Nous avons examiné l'effet de ces facteurs sur le taux de désamination et sur le pourcentage de phénylalanine disparue dans des suspensions lavées de bactéries et dans le jus de rumen.

Pour les valeurs comprises entre 6 et 8, le pH des milieux artificiels est ajusté par le jeu des concentrations des solutions de phosphates mono- et bipotassique. Les pH plus bas sont obtenus par addition de HCl N, et plus élevés par addition de NaOH N. C'est également par le jeu de ces deux dernières solutions que l'on ajuste les jus de rumen aux différents pH choisis.

TABLEAU XVI

EXPÉRIENCES	N-AMMONIACAL					PHÉNYLALANINE									
	1	2	3	4	5	1		2		3		4		5	
						1,65	Disparue %	1,65	Disparue %	1,65	Disparue %	1,65	Disparue %	1,65	Disparue %
0 heure : Témoin. .	0,20	0,15	0,10	0,10	0,24										
8 heures :															
Témoin. .	1,20	1,54	1,05	0,96	1,85	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Phénylalanine.	1,57	1,80	1,53	1,30	2,25	12,5	30	11,4	31	9,6	42	10,8	35	8,6	48
Maltose.	0,60	0,40	0,72	0,48	0,75	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Phénylalanine + maltose. . . .	0,54	0,40	0,81	0,50	0,68	10,2	38	10,4	37	8,6	48	9,9	40	7,9	52
24 heures :															
Témoin. .	1,84	1,32	0,95	0,85	2,90	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Phénylalanine.	2,62	1,32	1,45	1,20	3,94	4	75	3,3	80	1,3	92	4,4	74	0	100
Maltose.	0,08	0,05	0,03	0,1	0,03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Phénylalanine + maltose. . . .	0,06	0,06	0	0,1	0,01	1	94	0	100	0	100	0,8	95	0	100

Les résultats sont exprimés en mg/100 ml de milieu d'incubation.

La mesure des dégagements d'ammoniac donne des résultats assez irréguliers, du fait de l'interférence de plusieurs phénomènes, mais cependant significatifs si l'on s'adresse à un très grand nombre d'expériences. Par contre, les valeurs du taux de disparition de la phénylalanine à 8 heures et à 24 heures sont beaucoup plus probantes. Aussi sur les graphiques (fig. 12) les résultats seront exprimés en pourcentage de phénylalanine disparue.

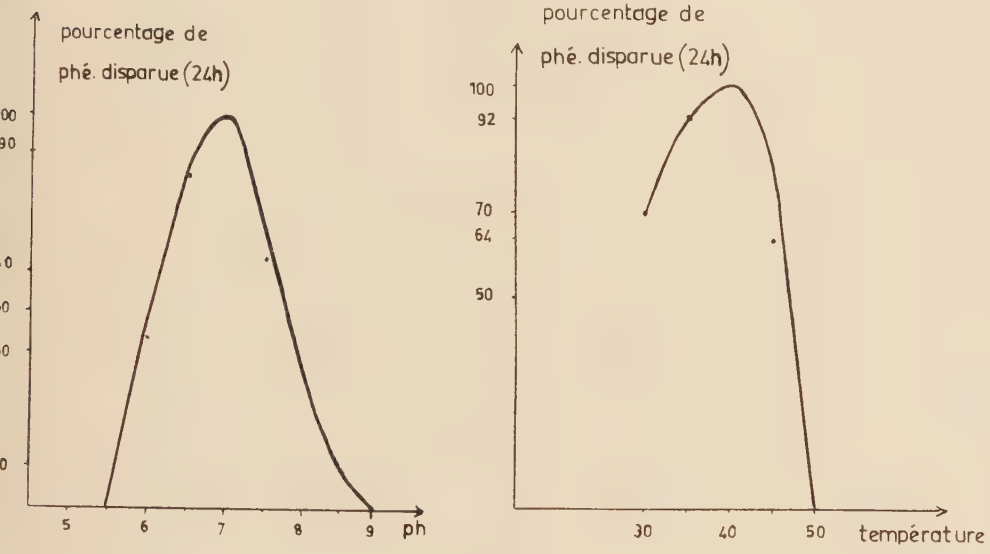


Fig. 12

Influence du pH et de la température sur le catabolisme de la phénylalanine par des suspensions lavées de bactéries du rumen.

Il en ressort que le pH optimum de la dégradation de la phénylalanine est aux environs de 7, compromis entre le pH optimum des désaminases qui est alcalin et celui des décarboxylases qui est acide.

La température optimum se situe dans une zone comprise entre 35 et 40°C, condition réalisée dans le rumen.

2. Facteurs chimiques et biologiques

α) *Jus de rumen:* la fermentation de la phénylalanine est plus intense dans le jus de rumen que dans le milieu artificiel.

β) *Présence d'urée:* l'urée apporte de l'ammoniac facilement accessible aux bactéries; de plus l'ammoniac est un

facteur indispensable pour certaines d'entre elles (Bryant et coll., 1962). Les bactéries pourraient à ce moment-là intégrer directement la phénylalanine dans leurs molécules protéiques. Mais cet acide aminé ne semble pas pour autant être plus vite utilisé.

γ) *Couples d'amino-acides :* encouragée par les résultats de Lewis (1955) qui observe un dégagement d'ammoniac beaucoup plus rapide avec le couple alanine-proline qu'avec la proline ou l'alanine isolément, nous avons essayé le couple phénylalanine-proline, mais sans succès. La réaction de Stickland semble spécifique de l'alanine et de la proline dans le rumen. Elle n'a d'ailleurs été signalée que pour ces deux acides aminés par El-Shazly.

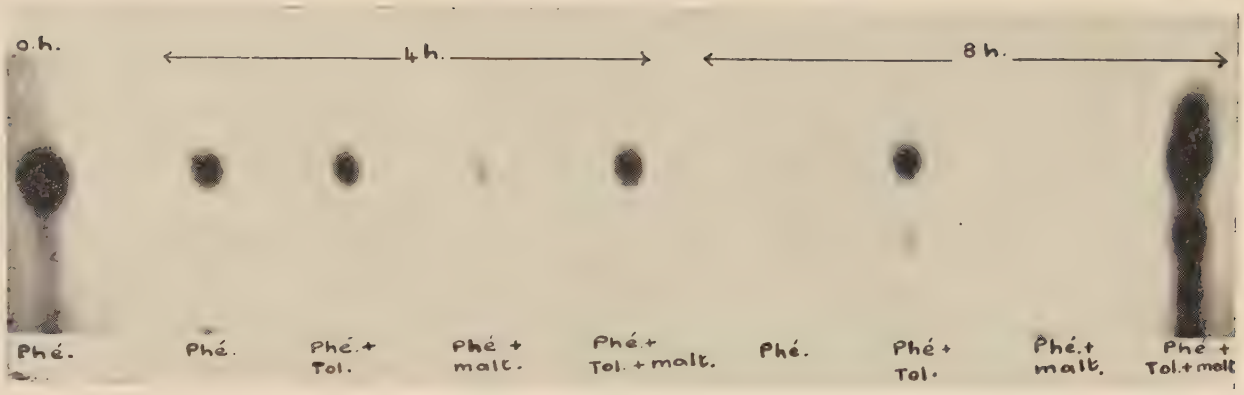
Facteurs défavorables

Une trop grande quantité de *maltose* (> 1 %) gêne l'action désaminante des bactéries. En effet, le maltose est transformé en acide lactique qui s'accumule dans le milieu artificiel, abaisse le pH et favorise l'hydrolyse. Il n'est bien fermenté qu'en présence de protides ou d'acide glutamique. En plus de leur action acidifiante, les glucides ont une action propre sur les désaminases qui n'est pas encore élucidée.

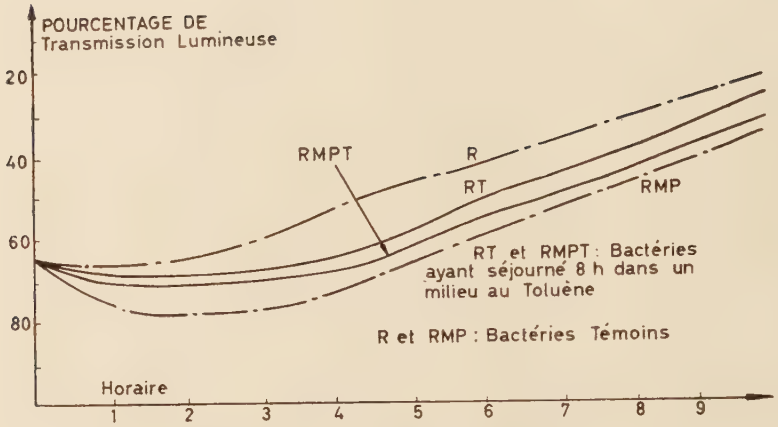
La présence de *toluène* au taux de 5 % empêche le métabolisme de la phénylalanine, qui reste intacte dans le milieu (tableau XVII et fig. 13). Warner (1956) a constaté l'accumulation d'acides aminés dans le milieu d'incubation par l'usage du toluène: les protéases fonctionnent normalement, tandis que les désaminases semblent inhibées. Or le toluène pourrait seulement empêcher la formation des désaminases comme il empêche celle de l'allantoïnase (Durand).

Mais il convenait de savoir si le toluène était bactéricide ou seulement bactériostatique. Les résultats effectués au laboratoire (Begarie et coll., 1961) montrent d'une part qu'il n'y a pas de multiplication bactérienne en présence de toluène dans un milieu maltosé et peptoné, milieu qui favorise la croissance des bactéries témoins; d'autre part les bactéries qui sont restées en contact avec le toluène pendant 24 heures au bain-marie à 39°C, une fois lavées et repiquées dans différents milieux, sont capables de se multiplier : l'utilisation du biophotomètre Bonet et Maury permet d'observer simultanément le comportement de quatre cultures (fig. 14). Le toluène n'est donc pas bactéricide pour les bactéries du rumen qui sont restées à son contact pendant 24 heures.

Fig. 13



Influence du toluène et du maltose sur la dégradation de la phénylalanine par des suspensions lavées de bactéries du rumen



Croissances des divers lots bactériens mesurées au biophotomètre Bonet-Maury.

FIG. 14

La phénylalanine est-elle « assimilée » par les bactéries de la panse ?

La chromatographie des acides aminés libres du « pool » intrabactérien (fig. 15) montre la phénylalanine en quantité notable quand les bactéries ont préalablement séjourné dans un milieu contenant à la fois phénylalanine et maltose. Sans source glucidique la phénylalanine ne pénètre pas dans le « pool » (tableau XVIII). Il est, en effet, connu que l'incorporation d'acides aminés dans la cellule bactérienne requiert une source d'énergie; nous discuterons plus loin de l'intervention des perméases.

D'autre part, il est intéressant de noter sur le chromatogramme une augmentation de tous les acides aminés du « pool » en même temps que l'apparition de phénylalanine (voir la fig. 15 et le tableau XIX).

On peut émettre deux hypothèses pour interpréter ces résultats : l'ammoniac provenant de la désamination de la phénylalanine a déjà été converti en amino-acides dans le

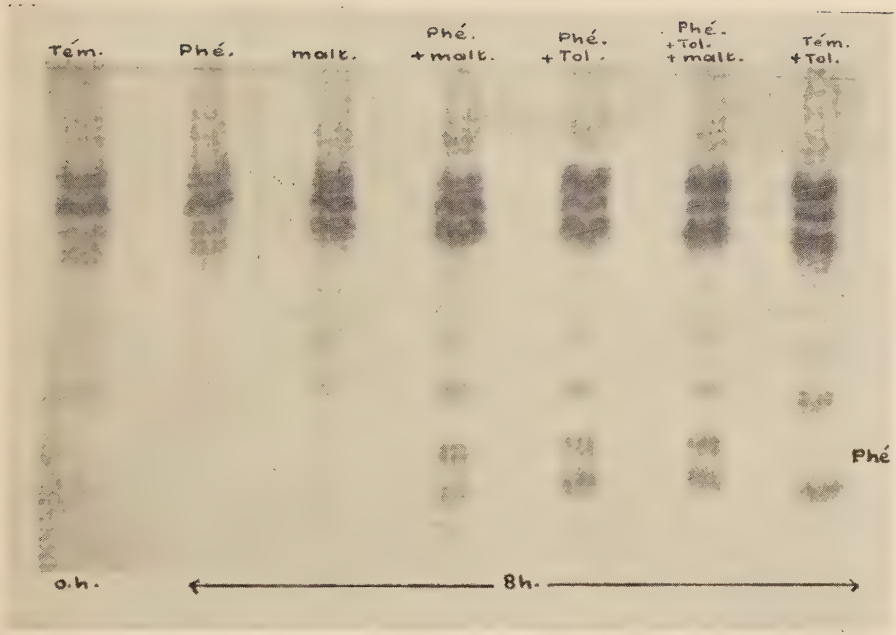


Fig. 15

Passage de la phénylalanine dans le « pool » bactérien
(8 heures d'incubation)

« pool » intrabactérien. Ces acides aminés nouveaux avec la phénylalanine absorbée sont prêts pour l'élaboration des protéines bactériennes.

Mais il se pourrait aussi qu'en présence de maltose seul, il y ait utilisation des acides aminés libres, les bactéries n'ayant pas d'autres ressources azotées; tandis qu'en présence de phénylalanine, l'ammoniac et l'acide aminé apportés épargneraient la réserve des acides aminés libres de la cellule. Il est certain que ces deux phénomènes doivent jouer dans le « turnover » protidique, ce qui est une preuve supplémentaire qu'aucun acide aminé n'est essentiel pour l'ensemble de la flore du rumen.

TABLEAU XVII

Influence du toluène sur le métabolisme de la phénylalanine

	Quantité de phénylalanine en mg/ 100 ml de milieu d'incubation						
		MILIEU RUMEN			MILIEU ARTIFICIEL		
	0 h	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
Phénylalanine. . .	16,5	7	4	0	12	8	2
Phénylalanine + maltose	16,5	3,5	2	0	10	6,2	1
Phénylalanine + toluène.	16,5	15	14,5	17,5	16,5	17	16
Phénylalanine + maltose + toluène.	16,5	14,8	15,5	18,4	17	17,4	18

TABLEAU XVIII

Etude du passage de la phénylalanine dans le « pool » intrabactérien

	PRÉSENCE DE PHÉNYLALANINE SUR LE CHROMATOGRAMME	QUANTITÉ DE PHÉNYLALANINE EN D.O. 10^2 POUR 8 mg DE BACTÉRIES (1)	QUANTITÉ DE PHÉNYLALANINE EN μg POUR 100 mg DE BACTÉRIES
Témoin.	0	7,5	0
Phénylalanine.	0	7,5	0
Maltose.	0	7,5	0
Phénylalanine + maltose.	++	9,3	25

Les suspensions lavées de bactéries sont incubées 8 heures en présence des différents substrats; après extraction des acides aminés du « pool » intrabactérien, on procède au dosage chromatographique de la phénylalanine selon PASIEKA.

(1) Pour rendre le dosage plus sensible, nous avons ajouté 5 μg de phénylalanine (D.O. 10^2 = 7,5) à chaque tache de départ du chromatogramme.

TABLEAU XIX

Les acides aminés libres intrabactériens en fonction du milieu extérieur

EXPÉRIENCES	1	2	3	4	5
Maltose.	400	315	512	257	486
Maltose + phénylalanine. . . .	525	375	607	289	568

Les valeurs des acides aminés libres sont exprimées en µg d'acide glutamique pour 100 mg de bactéries ayant séjourné 8 heures à 39°C, soit dans un milieu maltosé, soit dans un milieu maltosé avec de la phénylalanine.

L-TYROSINE

Le métabolisme de la tyrosine par les bactéries du rumen est plus délicat à saisir que celui de la phénylalanine du fait :

— de la faible solubilité dans l'eau de cet acide aminé,
— de son attaque très lente par les bactéries en suspension dans un milieu artificiel,
— des métabolites terminaux inhabituellement trouvés chez les bactéries.

1° La solubilité de la tyrosine est de 0,048 g % à 25°C. Si on l'utilise à une concentration légèrement supérieure, il suffit de chauffer préalablement le milieu de culture vers 75°C; par refroidissement de ce milieu à 39°C, la tyrosine restera en solution saturée.

Par contre, la N-acétyl-tyrosine est très soluble dans l'eau. Mais le groupement acétyl- bloque tout métabolisme et l'acétyl-tyrosine reste intacte dans le milieu de culture. Les bactéries du rumen ne possèdent pas d'acétylase.

Mais étant donné que l'attaque de la tyrosine par les bactéries est lente et que la cinétique de la réaction n'est pas accélérée par une élévation de la concentration au-dessus de 0,1 millimole pour 100 ml, cette faible solubilité n'est pas gênante dans nos expériences.

2° Cinétique de disparition de la tyrosine.

Les essais ont été effectués sur 16 échantillons bactériens

incubés en présence de différents taux de tyrosine, soit dans la liqueur du rumen, soit dans le tampon phosphates avec ou sans maltose.

Sur les chromatogrammes on peut estimer subjectivement (cf. Scriban) la diminution de la tyrosine après 24 heures d'incubation, de 75 à 100 % en milieu naturel et de 50 à 100 % en milieu artificiel (fig. 16). La présence de maltose

Fig. 16

Cinétique de disparition de la tyrosine, par des suspensions lavées de bactéries du rumen, en présence de maltose.

au taux de 0,4 % dans le tampon phosphates favorise le métabolisme de cet acide aminé.

3° Mise en évidence des produits terminaux du métabolisme.

a) *L'ammoniac :*

Tout comme pour la phénylalanine, la désamination est lente et masquée dans un milieu maltosé. Nous en donnerons quelques chiffres ultérieurement.

b) *Le gaz carbonique :*

La décarboxylation sera étudiée dans un tableau d'ensemble groupant tous les acides aminés cycliques (tableau XXVIII).

c) *Les acides gras volatils :*

On sait que la fonction hydroxyle sur le noyau aromatique facilite l'ouverture du cycle. Il est probable que la dégradation de la tyrosine en acides homogentisique, puis fumarique et acéto-acétique, principale voie utilisée chez les mammifères, est aussi empruntée par quelques micro-organismes. La flore du rumen est si variée et comprend un si grand nombre d'espèces que l'on pouvait éventuellement rechercher un tel type de réaction dégradative. Nous avons donc dosé l'acidité volatile après entraînement à la vapeur d'eau dans des incubats de 24 heures avec tyrosine ou avec tyrosine et maltose. Nous n'avons trouvé aucune différence significative avec les témoins correspondants incubés sans tyrosine. C'est donc que le catabolisme de cet acide aminé emprunte une tout autre voie.

d) *Les phénols et les acides phénoliques :*

Nous avons tout d'abord recherché les composés phénoliques par la technique d'étude des produits de fermentation des anaérobies préconisée par Prévot. Le filtrat de 200 ml de culture préalablement amené à pH = 8,2 est distillé. On recueille 30 ml de distillat qui doit contenir les corps phénoliques. Par addition de réactif de Millon se développe une coloration rose saumon qui n'apparaît pas dans le distillat témoin. C'est donc que le premier distillat renferme un ou plusieurs composés à fonction phénol dont il faut déterminer la nature.

Les réactions d'identification du phénol (au $FeCl_3$) et des crésols (au formol et SO_4H_2) sont négatives. Nous avons alors recherché l'existence d'acides phénoliques par chromatographie sur papier des extraits éthérés des incubats de 8 heures et de 24 heures dans le solvant tamponné de Fewster et Hall. Nous avons mis en évidence un acide phénolique qui migre en même temps que *l'acide p-hydroxyphénylacétique* et qui donne la même réaction jaune-rosé au réactif de Millon. Mais cet acide ne rend pas compte

quantitativement de la tyrosine disparue: un quart environ en 24 heures; et, de plus, il n'apparaît pas obligatoirement sur chaque chromatogramme.

e) *Autres produits du catabolisme de la tyrosine :*

Nous voudrions maintenant rapporter ici quelques résultats qui nous ont paru plus surprenants; il s'agit de l'apparition sur nos chromatogrammes de composés qui ne sont généralement pas considérés comme pouvant dériver de la tyrosine, à savoir *l'acide phénylpropionique,* et même dans trois cas *la phénylalanine.* La présence de ces corps est surprenante parce que leur origine à partir de la tyrosine implique nécessairement une réduction, la suppression d'un oxhydrile du noyau benzénique. Or si l'oxydation de la phénylalanine en tyrosine se fait facilement dans les cellules vivantes, en revanche la réaction inverse est loin d'être classique.

En effet, il apparaît sur nos chromatogrammes (fig. 17)

Fig. 17

Formation d'acide phénylpropionique au cours d'incubation *in vitro* de tyrosine.
Le chromatogramme a été révélé au NO_3Ag-ammoniacal.

un acide qui ne réagit pas au réactif de Millon et que nous avons caractérisé par son Rf dans différents solvants ainsi que par des réactions colorées (isabelle au nitrate d'argent ammoniacal et blanc au réactif : ferricyanure de potassium-perchlorure de fer) : *l'acide phénylpropionique.*

De plus, dans trois expériences, nous avons noté l'apparition de quantités croissantes de phénylalanine en même temps que disparaissait la tyrosine; la première tache était visible sur le chromatogramme après 4 heures d'incubation, grossissait après 8 heures et après 24 heures, alors qu'aucune trace de cet acide aminé n'apparaissait dans le témoin dépourvu de tyrosine. Il était, en outre, tentant de relier l'acide phénylpropionique au métabolisme de la phénylalanine qui serait elle-même issue de la tyrosine. En effet, l'acide phénylpropionique est un métabolite bien connu de la phénylalanine et on a isolé de certaines plantes une phénylalanine-désaminase (Koukol et coll., 1961), que nous n'avons d'ailleurs pas pu mettre en évidence dans le contenu du rumen, et cette relation reste très incertaine.

Nous hésitions à publier ces résultats sans les avoir contrôlés par l'utilisation de corps marqués, mais tout récemment nous avons trouvé dans la littérature deux références qui renforcent singulièrement les conclusions de nos expériences.

Des mutants d'*E. coli* et de *Neurospora crassa* seraient capables de catalyser l'interconversion réversible de la phénylalanine et de la tyrosine, puisque l'un ou l'autre de ces acides aminés permettent la croissance de ces mutants dans un milieu privé de tout autre amino-acide. Il est vrai que cet argument de Fruton et Simmonds est loin d'être déterminant.

Mais le travail intéressant est celui récemment paru de Scott, Ward et Dawson (1963) et qui de plus est relatif aux bactéries du rumen : après 3 heures d'incubation de L-C^{14}-tyrosine dans un rumen artificiel, ces auteurs retrouvent 82 % de la radioactivité dans *l'acide phénylpropionique*; ce qui est une preuve sérieuse de la transformation de la tyrosine en acide phénylpropionique, acide que nous avons mis en évidence sur nos chromatogrammes.

D'après les premiers résultats de ces auteurs, l'acide phénylpropionique se formerait par l'intermédiaire de l'acide p-hydroxyphénylpropionique. Toutefois le problème reste entier, par quel mécanisme les bactéries arrachent-elles

l'hydroxyle du noyau benzénique ? Mais bien que ce mécanisme soit inconnu, cette transformation présente un intérêt biologique qui n'est pas douteux.

B. Composé à noyau imidazole

La L-HISTIDINE

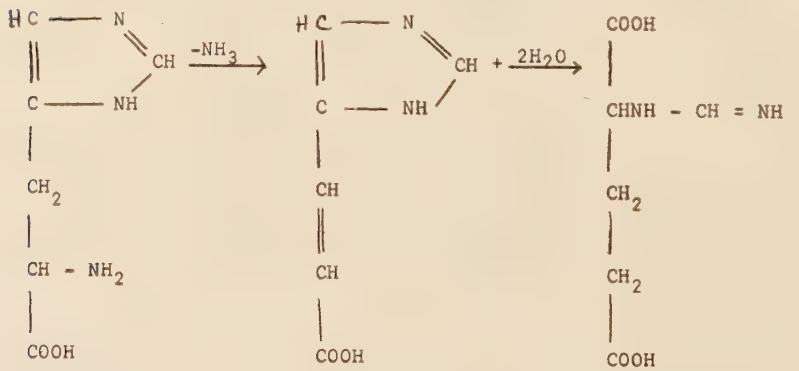
En 1937, Wood et Clifton découvrent que l'histidine est désaminée par *Clostridium tetanomorphum*. En 1941, Pickett montre que des suspensions de *Cl. tetani* désaminent l'histidine avec ouverture du cycle imidazole et formation d'acides butyrique et acétique. Cohen et coll. (1948) rapportent un phénomène analogue avec des suspensions lavées de *Cl. saccharobutylicum*. Selon Whiteley (1957), *Micrococcus aerogenes* dégrade l'histidine en NH_3, CO_2, acétate, butyrate, lactate et traces de formiate, avec l'urocanate comme intermédiaire.

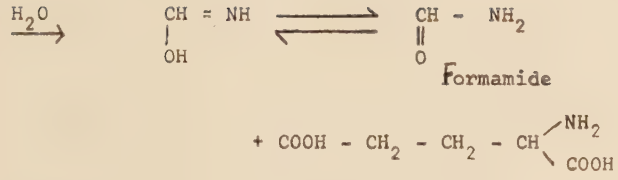
Les voies de dégradation de l'histidine semblent être les mêmes chez ces germes anaérobies que chez les germes aérobies tels *Pseudomonas fluorescens* et *Aerobacter aerogenes*, aussi bien que dans le foie des Mammifères.

La désamination est due à une histidase, analogue à celle découverte par Edlbacher et Kraus (1930) dans les tissus. L'urocanate est ensuite dégradé en L-α-formiminoglutamate par un système appelé urocanase.

$$\text{Histidine} \xrightarrow[\textit{A. aerogenes}]{\textit{Cl. tetanomorphum}} \text{formamide} + \text{glutamate}.$$

L'enchaînement des réactions semble être le suivant :





Ac. glutamique

Le mécanisme de ces réactions n'est pas entièrement connu. Le passage de l'acide formimino-glutamique à la formamide et à l'acide glutamique peut se faire par une simple hydrolyse ou par transfert du groupe formimino- sur l'acide tétrahydrofolique (THFA), réaction bien connue dans le foie des Mammifères et chez *Cl. cylindrosporum* (Rabinowitz et coll., 1956).

Enfin, en milieu acide, l'histidine peut être décarboxylée en histamine par plusieurs espèces de clostridies, dont *Cl. welchii* et *Cl. paludis* (Gale) (1941). Des extraits de *Pseudomonas* peuvent convertir l'histamine en aspartate et formiate par la voie de l'acide imidazol-acétique (Hayaishi et coll., 1957).

Résultats expérimentaux

Les expériences sont faites avec des bactéries du rumen de mouton fistulisé en présence de :

0,1 millimole d'histidine pour 100 ml de milieu naturel ou artificiel,

0,4 % de maltose (facultatif),

0,02 % d'urée (facultatif).

TABLEAU XX

Cinétique de dégradation de l'histidine par les bactéries du rumen dans des expériences « in vitro »

TEMPS D'INCUBATION	QUANTITÉS D'HISTIDINE EN mg/100 ml DE MILIEU			
	0 h	4 h	8 h	24 h
Rumen + histidine	15,5	13,5	7	0
Rumen + histidine + maltose	15,5	12	3	0
Histidine + urée	15,5	—	12,6	5
Histidine + maltose + urée	15,5	—	12,5	2,4
Histidine	15,5	11	7	0
Histidine + maltose	15,5	11	6,5	0

Comme on peut le voir sur le tableau XX, le maltose, pas plus que l'urée, ne semblent activer le métabolisme de l'histidine.

Parallèlement, il apparaît de l'acide glutamique, de l'ammoniac et du gaz carbonique dans nos milieux (voir fig. 18 et 19 et tableau XXVIII).

Les bactéries du rumen possèdent donc histidase et urocanase.

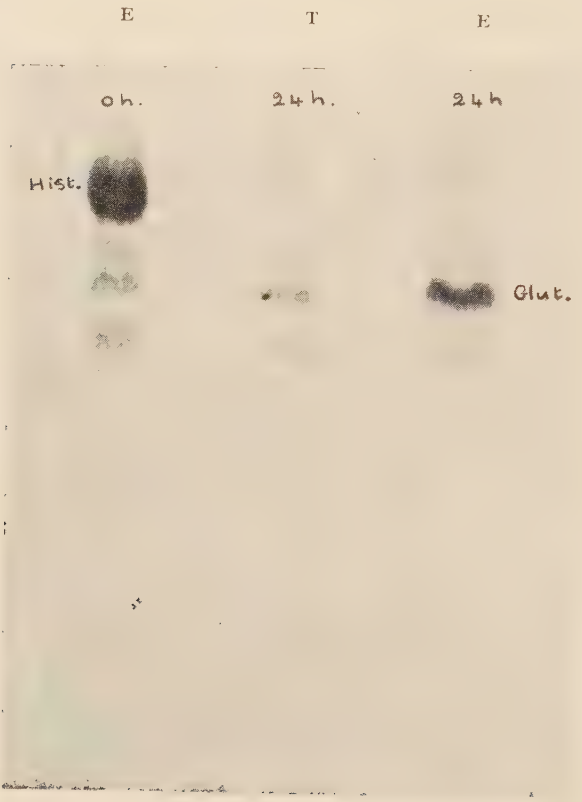


Fig. 18

Transformation de l'histidine, en acide glutamique dans des expériences *in vitro* réalisées dans le jus de rumen (24 heures d'incubation).

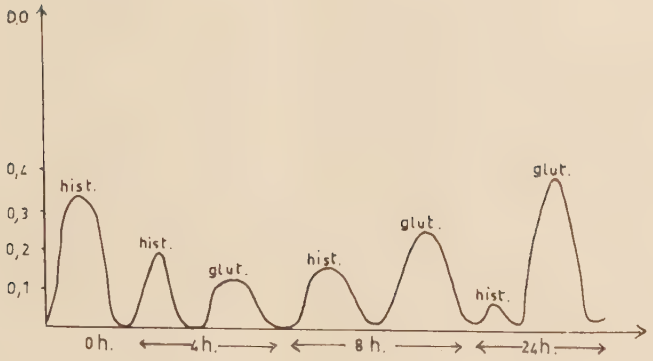


FIG. 19

Cinétique de disparition de l'histidine et de l'apparition de l'acide glutamique dans des expériences *in vitro* réalisées en milieu artificiel. Cette courbe a été obtenue par enregistrement direct des taches chromatographiques à l'aide du densitomètre Jouan.

La première étape de la conversion de l'histidine en acide urocanique n'a pas pu être mise en évidence dans nos milieux, par contre l'acide glutamique s'accumule en milieu artificiel. Il est converti en acides butyrique et acétique en milieu rumen. Nous n'avons pas trouvé d'histamine, ni dans le rumen de mouton normal, ni parmi les catabolites de l'histidine. Or DOUGHERTY et coll. (1949) révèlent la présence de composés toxiques dans la liqueur du rumen de mouton souffrant d'indigestion. Une injection I.V. de ce liquide du rumen chez le chien ou le mouton anesthésiés provoque une hypotension prolongée et une diminution de la motilité du rumen comme le ferait l'histamine. DAIN et coll. (1955) identifient l'histamine parmi les constituants toxiques des ingesta de rumen de moutons expérimentalement suralimentés. Ils trouvent des valeurs de l'ordre de 70 μl/ml. La production de cette amine est considérablement augmentée quand le pH tombe au-dessous de 5, pH optimum d'action de la plupart des décarboxylases. RODWELL (1953) a isolé de la panse d'un mouton suralimenté huit espèces de Lactobacilles capables de décarboxyler l'histidine. Des ingesta normaux sont dépourvus d'histamine.

Cependant, SHINOZAKI (1957) identifie histamine et méthylamine dans la plupart des échantillons de rumen d'animaux nourris avec « ladino clover ». Le taux d'histamine s'élève de 2,9 à 5,6 μg/ml. L'histamine introduite dans la panse ne semble pas être absorbée.

C. Les composés à noyau pyrrolidine

Nous avons essayé de suivre par des expériences *in vitro* les transformations subies, dans le rumen, par quelques composés à noyau pyrrolidine : à côté des acides aminés, L-proline et L-hydroxyproline, deux composés voisins, l'acide L-5-pyrrolidone-2-carboxylique et la 2-pyrrolidone, ont attiré notre attention, le premier parce qu'il est généralement un produit de déchet chez les Mammifères, le second parce qu'il ne diffère du précédent que par la disparition du groupement —COOH.

La proline peut être oxydée en acide glutamique, mais en anaérobiose on ne connaît pas d'autre voie catabolique de la proline et de l'hydroxyproline que leur réduction par réaction de Stickland. La proline est réduite en acide δ-amino-valérique, mais le produit de réduction de l'hydroxyproline n'a jamais été caractérisé.

La réaction de Stickland est une réaction couplée d'oxydo-réduction entre deux acides aminés, l'un fonctionnant comme donateur de H_2, l'autre comme accepteur. L'expérience originale fut faite avec *Clostridium sporogenes* qui se montra capable de pousser sur un milieu d'acides aminés sans sucre : cet organisme était donc capable de puiser son énergie d'une réaction de ce type.

Les acides aminés donateurs de H_2 furent détectés par leur pouvoir de réduction du bleu de méthylène en leuco-dérivé incolore : alanine, valine, leucine, se montrèrent d'actifs donateurs de H_2, tandis que phénylalanine, acides aspartique et glutamique le furent beaucoup moins. Les accepteurs de H_2 doivent restituer la couleur des leuco-dérivés de la phénol-safranine et du violet de benzyle; proline, hydroxyproline et glycine sont réduites par ce système.

Stickland (1934) plaça dans un tube de Thunberg une suspension lavée de bactéries en présence d'un acide aminé donateur de H_2 et d'un acide aminé accepteur de H_2 et il mesura la désamination. De cette façon, Stickland démontra que les deux acides aminés ensemble étaient désaminés, tandis que chacun pris individuellement ne l'était pas. On voit l'importance d'une telle réaction pour les anaérobies stricts qui ne peuvent pas utiliser l'O_2 comme accepteur de H_2. Stickland propose que la réaction suivante :

$CH_3—CH(NH_2)—COOH + 2$ $- COOH + 2\ H_2O$

$\longrightarrow 2\ NH_2(CH_2)_4 — COOH + NH_3 + CO_2 + CH_3—COOH$

représente la somme de trois réactions séparées :

(*a*) $CH_3—CH(NH_2)—COOH + H_2O \longrightarrow NH_3 +$

$CH_3—CO—COOH + 2\ H$

(*b*) $CH_3—CO—COOH + H_2O \longrightarrow CH_3—COOH + CO_2 + 2\ H$

(*c*) $4\ H + 2$ $- COOH \longrightarrow 2\ NH_2\ (CH_2)_4—COOH$

Ici la proline n'est pas désaminée, tandis que si l'on met alanine et glycine, les deux amino-acides sont désaminés : $CH_3 — CH\ (NH_2) — COOH + 2\ NH_2 — CH_2 — COOH + 2\ H_2O \longrightarrow 3\ NH_3 + CO_2 + 3\ CH_3—COOH$.

A côté de *Clostridium sporogenes*, toutes les Clostridies décrites par Nisman, Raynaud et Cohen (1948) empruntent cette voie métabolique. Les anaérobies facultatifs, tels *Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*, sont dépourvus des enzymes de la réaction de Stickland qui semble limitée jusqu'à présent aux espèces protéolytiques des Clostridiaceae.

Rosenberg et Nisman (1949) ont montré que les anaérobies stricts possèdent un système enzymatique capable d'utiliser l'oxygène comme accepteur de H_2. Nisman et Vinet (1949 a) observent que les acides aminés donateurs de H_2 sont principalement convertis en acides gras correspondants, tandis que les acides aminés accepteurs de H_2 (1) entrent en compétition avec l'oxygène pour capter le H_2 libéré par l'autre groupe d'acides aminés. Le système transporteur serait la diphosphopyridine nucléotide (DPN) (Nisman, 1954). En effet, le DPN peut être réduit par l'alanine et le coenzyme réduit peut être réoxydé par la proline ou la glycine.

(1) En présence d'arsénite qui inhibe le transfert de H_2 à l'acide aminé accepteur, mais n'a aucun effet sur l'acide aminé donneur de H_2 du système, c'est l'O_2 seul qui sert d'accepteur (Nisman, Vinet, 1949b).

La première étape de la réaction de Stickland est probablement catalysée par un type de L-amino-acide-oxydase qui, avec l'aide d'un ou plusieurs transporteurs de H_2 (DPN), peut amener le H_2 à l'acide aminé, au colorant ou à l'oxygène.

Les acides cétoniques (pyruvique) sont décarboxylés par un mécanisme qui pourrait entraîner la formation d'une liaison ester phosphorique riche en énergie :

$$CH_3 - CO - COOH + H_3PO_4 \longrightarrow$$
$$CH_3CO - PO_3H_2 + 2\,H + CO_2.$$

Il y a un manque complet de connaissance concernant la réaction (*c*) : c'est-à-dire le mécanisme par lequel l'acide aminé est réduit en acide volatil.

Essais personnels

Les composés pyrroliques sont mis à incuber seuls, soit avec la liqueur du rumen, soit avec une suspension lavée de bactéries de bovins d'abattoir, à la concentration de 0,2 millimole pour 100 ml. Le milieu nutritif de certains tubes est enrichi soit avec du maltose au taux de 0,4 %, soit avec maltose (0,4 %) et urée (0,02 %).

Des échantillons pour étude chromatographique des acides aminés ou des acides organiques fixes sont prélevés à 4, 8 et 24 heures.

Des dosages d'azote ammoniacal sont faits après 2, 4, 8 et 24 heures d'incubation.

Après entraînement à la vapeur d'eau, l'acidité volatile totale est déterminée quantitativement par dosage avec de la NaOH N/20 et qualitativement par chromatographie sur papier selon la technique de Guillaume et coll. déjà décrite.

Résultats

La L-PROLINE

Elle est métabolisée en acide δ-aminovalérique par ouverture du cycle et réduction.

$$- COOH \xrightarrow{+\,H_2} NH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COOH$$

Dans le tampon phosphates seul, l'acide δ-aminovalérique apparaît à 4 heures, augmente à 8 heures et à 24 heures.

Par estimation chromatographique on constate que 75 à 100 % de la proline ont disparu (fig. 20).

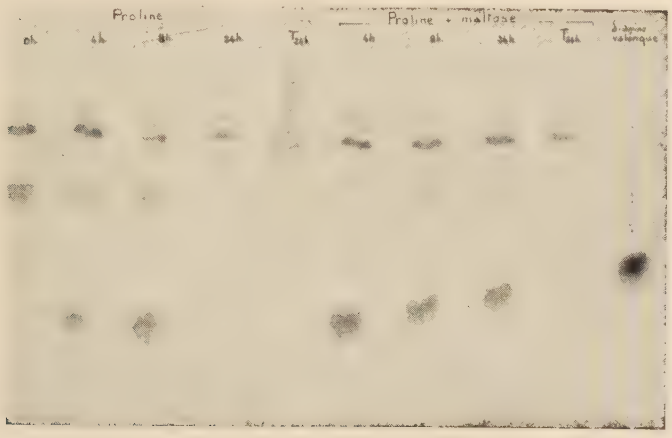


Fig. 20
Formation d'acide δ-amino-valérique à partir de la proline

L'addition de maltose au milieu d'incubation accélère les réactions d'ouverture du cycle et de réduction : après 24 heures d'incubation toute la proline a disparu. Dans le jus de rumen, ces réactions sont encore plus rapides; l'acide δ-aminovalérique lui-même a presque complètement disparu sur nos chromatogrammes à 24 heures : il a été désaminé en acide valérique, caractérisé par chromatographie.

Nous avions déjà remarqué la formation d'acide δ-amino-valérique au cours d'expérimentation sur la phénylalanine. En effet, pour augmenter la production d'ammoniac, nous avions essayé des couples d'acides aminés et, en particulier, phénylalanine-proline. El-Shazly (1952) avait caractérisé l'acide δ-aminovalérique en mettant en présence alanine et proline. Il démontrait que la formation de cet acide aminé était due à la réaction d'oxydo-réduction de Stickland, l'alanine (ou la phénylalanine) étant donateur de H_2 et la proline accepteur de H_2. Il ajoutait que la proline incubée seule dans du jus de rumen n'était pas transformée en acide δ-aminovalérique.

Contrairement à cette dernière affirmation, nos résultats prouvent que les microorganismes sont capables de réduire la proline après ouverture du cycle à l'aide de H_2 provenant

de tout autre source que d'un amino-acide, par exemple du maltose.

Les résultats de Dehority et coll. (1958), obtenus à l'aide de corps marqués, vont dans le même sens que nos expériences.

La L-HYDROXYPROLINE

Elle disparaît plus lentement que la proline; il en reste encore après 24 heures d'incubation, même en présence de maltose. Nous proposons pour le catabolisme de l'hydroxyproline un processus analogue à celui de la proline, c'est-à-dire ouverture du cycle et réduction, mais donnant cette fois l'acide δ-amino γ-hydroxy-valérique (fig. 21).

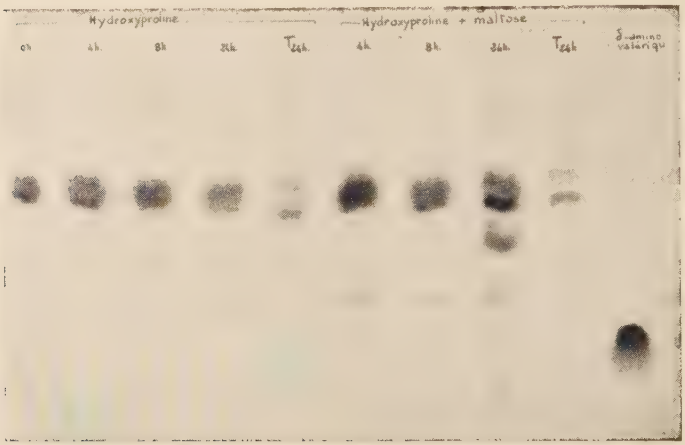
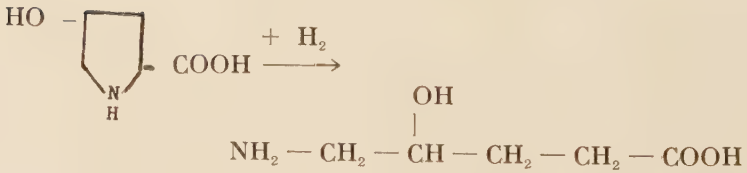


Fig. 21

Formation d'acide δ-amino-γ-hydroxy-valérique à partir de l'hydroxyproline

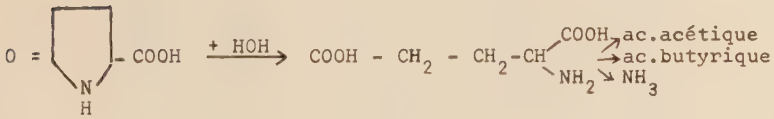


Nous avons identifié cet amino-acide sur le chromatogramme par son Rf plus petit que celui de l'acide δ-amino-valérique dans le solvant butanol/acide acétique [le groupement hydroxyle confère, en effet, aux hydroxy-amino-acides

une polarité plus grande, ce qui les rend plus solubles dans la phase stationnaire (eau) que leur analogue non hydroxylé], par sa coloration violet-brun à la ninhydrine qui caractérise les hydroxy-amino-acides. La réaction au Nessler-périodate n'a pas été positive, mais elle ne répond bien que si le groupement hydroxyle est voisin du groupement aminé, comme dans la sérine.

L'ACIDE L-PYRROLIDONE-CARBOXYLIQUE

Après 24 heures d'incubation, 50 % environ de cet acide sont métabolisés; le maltose ralentit cette réaction. Nous avions déjà signalé la présence de cet acide organique dans le rumen et montré qu'il n'était pas un produit de déchet pour le Ruminant. En effet, les bactéries le catabolisent en acides volatils, parmi lesquels nous avons identifié : les acides acétique et butyrique. Le mécanisme de cette transformation semble comporter l'ouverture du cycle, l'hydratation, la désamination et la décarboxylation. Le passage par l'acide glutamique est probable d'après nos résultats sur la 2-pyrrolidone, rapportés ci-dessous, et d'après les produits terminaux que nous avons mis en évidence.



La 2-PYRROLIDONE

Métabolite voisin du précédent, puisqu'il ne diffère que par la disparition du carboxyle, la 2-pyrrolidone nous a permis de saisir une étape intermédiaire de la formation des acides gras volatils. Nous avons, en effet, pu mettre en évidence la formation d'acide *γ-aminobutyrique* par des incubations en présence de maltose et d'urée ou mieux de maltose, d'urée et de toluène (5 %) (fig. 22). On sait, en effet, que le maltose ne favorise pas l'action des désaminases et que le toluène les inhibe. Un dosage et une étude chromatographique des acides volatils d'un incubat de 24 heures

montrent une augmentation des acides butyrique, propionique et acétique. La réaction proposée est donc la suivante :

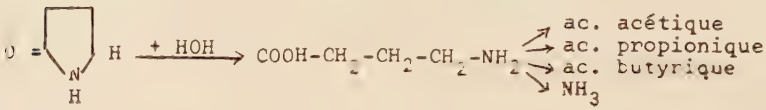


Fig. 22
Formation d'acide γ-amino-butyrique
à partir de la 2-pyrrolidone

Etude de la désamination

des composés a noyau pyrrolidine

En milieu artificiel, on n'observe pas de dégagement d'ammoniac dans les liquides d'incubation ni avec la proline, ni avec l'hydroxyproline, ni avec l'acide pyrrolidone-carboxylique. En effet, en présence des deux acides aminés il y a accumulation soit d'acide δ-amino-valérique, soit d'acide δ-amino-γ-hydroxy-valérique. Quant à l'acide pyrrolidone-carboxylique, son métabolisme est beaucoup trop lent; de ce fait l'ammoniac est utilisé par les bactéries au fur et à mesure de sa formation et ne peut être dosé. Beaucoup plus intéressant est le cas de la 2-pyrrolidone, puisqu'elle nous a permis non seulement de saisir une étape intermédiaire de son métabolisme, mais encore de mettre en évidence le dégagement d'ammoniac.

Sur le graphique (fig. 23) on peut suivre le dégagement de

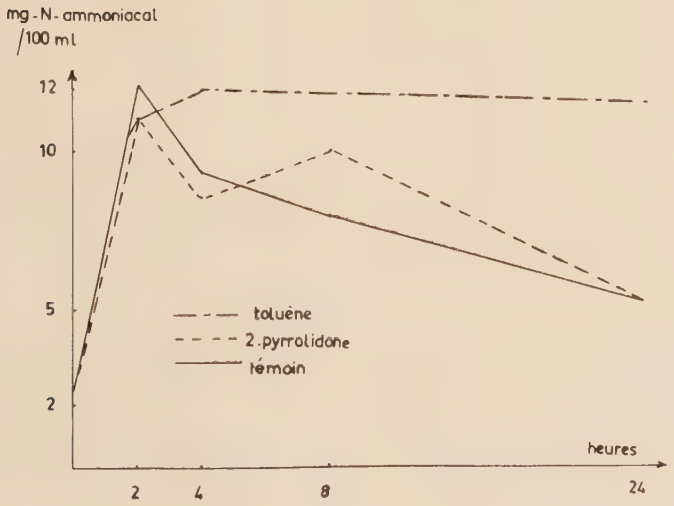


Fig. 23
Dégagement d'ammoniac à partir de l'urée et de la 2-pyrrolidone avec ou sans toluène

l'ammoniac au cours des heures d'incubation de suspensions lavées de bactéries en présence de différents substrats :

1) maltose (0,4 %) + urée (0,02 %) ;

2) maltose + urée + 2-pyrrolidone (0,4 mMole) ;

3) maltose + urée + 2-pyrrolidone + toluène (5 %).

Le premier pic correspond à l'action de l'uréase qui est très rapide, le second à la désamination de l'acide γ-amino-butyrique, produit intermédiaire du catabolisme de la 2-pyrrolidone.

En présence de toluène, l'uréase n'est pas inhibée et l'ammoniac, qui n'est pas utilisé par les bactéries, s'accumule dans le milieu; par contre, le cycle de la 2-pyrrolidone est ouvert, mais l'acide γ-amino-butyrique n'est pas désaminé.

En absence de toluène, l'ammoniac provenant de l'urée et de la 2-pyrrolidone est utilisé et l'on voit s'accumuler des acides volatils dans le milieu : après 24 heures d'incubation il se forme 0,5 millimole d'acides volatils à partir de 0,4 millimole du substrat pyrrolique.

Ainsi le métabolisme terminal des composés à noyau pyrrolidine aboutit à la formation d'acides gras volatils, principale source énergétique pour l'hôte animal.

D. **Un composé à noyau indol**

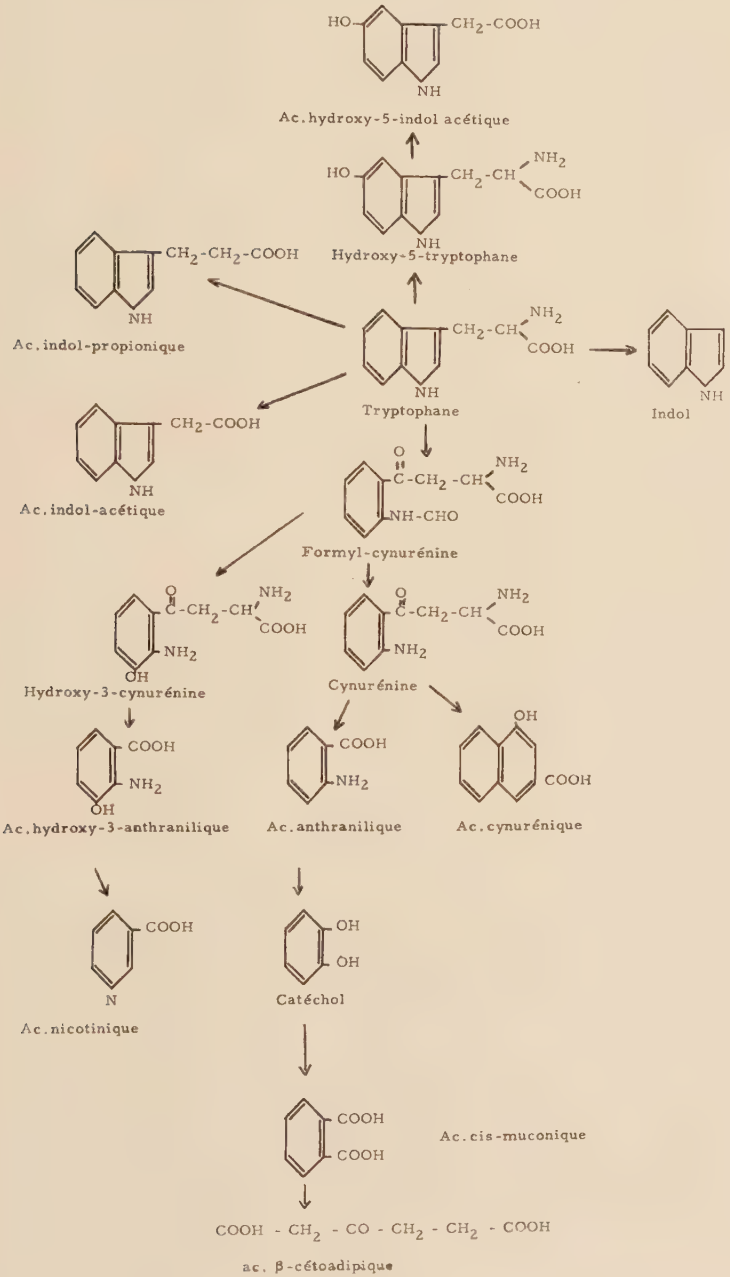
Le L-TRYPTOPHANE

Un grand nombre de microorganismes dégrade le tryptophane. Les voies métaboliques sont très différentes selon les espèces. Ainsi certaines bactéries peuvent dégrader cet acide aminé, en partie ou entièrement, selon la voie utilisée par les organismes supérieurs.

Stanier et ses élèves, utilisant la méthode d'adaptation simultanée, ont examiné plusieurs souches de *Pseudomonas* et trouvé qu'elles dégradaient toutes le tryptophane en cynurénine. Certaines catabolisent ce composé intermédiaire selon la *voie aromatique* aboutissant à l'acide anthranilique et au catéchol, tandis que d'autres empruntent la *voie quinoléine* pour former de l'acide cynurénique.

D'autre part, des mutants de *Neurospora* transforment la cynurénine en acide nicotinique (Mitchell et coll., 1948).

Principales voies de dégradation du tryptophane empruntées par les microorganismes



A côté de ces réactions métaboliques très spécifiques, les bactéries peuvent dégrader le tryptophane selon des processus beaucoup plus généraux, applicables aux autres acides aminés : c'est-à-dire par décarboxylation, désamination, coupure de la chaîne latérale, elles peuvent le transformer en divers composés à noyau indol. On peut dire que les bactéries dégradent le tryptophane selon la *voie indolique.*

Une suspension lavée de bactéries du rumen incubée pendant 24 heures en présence de peptones donne une réaction indol (ururoséine et Salkowski) légèrement positive; en présence de tryptophane, la réaction devient très fortement positive. En 1954, Spisni et Cappa ont signalé pour la première fois la présence de composés indoliques dans le contenu de la panse des bovins. Mais ils n'ont pas poussé plus loin leurs investigations. Nous avons, quant à nous, cherché à identifier les différents composés formés et à connaître leur origine et leur mode de formation.

Essais personnels

Le tryptophane (0,1 millimole) est mis à incuber dans 100 ml de suspension bactérienne à pH 6,8. Au cours des heures d'incubation, des échantillons sont prélevés pour l'estimation du tryptophane restant, l'extraction et l'identification des composés indoliques formés, le dosage de l'azote ammoniacal et la mesure des gaz dégagés.

Résultats

Sur quinze échantillons bactériens on a pu constater que seulement 20 à 25 % du tryptophane disparaissent après 8 heures d'incubation et la totalité après 24 heures. Cet acide aminé est plus vite dégradé en milieu aérobie qu'anaérobie, mais les métabolites terminaux sont les mêmes.

Nous avons isolé cinq composés indoliques dont les caractéristiques, Rf dans cinq solvants différents et réactions colorées, figurent sur le tableau XXI; ce sont : l'indol, le scatol, les acides indol-acétique, indol-propionique et hydroxy-5-indol-acétique.

TABLEAU XXI

Identification des produits de dégradation du tryptophane

	RF DANS LES SOLVANTS (1)					RÉACTIONS COLORÉES		
	1	2	3	4	5	Ehrlich	Salkowski	p-nitraniline
Indol.	0,92	0,92	0,92	0,00	0,40	Rose pourpre	Rose	Brun
Scatol.	—	0,95	—	—	0,60	Pourpre	Brun	Jaune
Acide indol-acétique. ..	0,87	0,50	0,36	0,62	0,00	Pourpre	Rose vif	Orange-brun
Acide indol-propionique.	0,92	0,60	0,45	0,36	0,15	Pourpre	Jaune pâle	Orange
Acide hydroxy-5-indol-acétique.	—	0,43	0,30	—	—	Bleu-vert	Bleu-vert	—

(1) La composition des solvants se trouve dans le chapitre des techniques.

Ces composés peuvent avoir une origine végétale ou être le résultat de l'activité métabolique des bactéries sur le tryptophane. L'expérimentation *in vitro* avec des suspensions lavées nous permet d'affirmer l'origine bactérienne de ces composés. L'indol et l'acide indol-acétique sont les composés les plus abondants et les plus constants. Le scatol et l'acide hydroxy-5-indol-acétique sont rarement présents dans nos milieux artificiels.

Nous allons maintenant examiner le mode de formation de ces différents catabolites :

1. *L'acide indol-acétique*

On sait que cet acide est un facteur de croissance pour les végétaux appelé auxine. Sa découverte aussi bien dans le règne végétal qu'animal — cette substance fut, en effet, isolée dans l'urine humaine avant sa mise en évidence dans le matériel végétal et son identification — a permis de démontrer, par la suite, que les enzymes des plantes aussi bien que les enzymes des bactéries pouvaient catalyser sa formation.

L'acide indol-acétique n'a jamais été signalé comme produit du catabolisme des bactéries du rumen. Or, dans nos conditions expérimentales, nous l'avons toujours mis en évidence et en quantité non négligeable (fig. 24).

Le mécanisme de sa formation n'est pas encore très bien établi. Le tryptophane peut être décarboxylé en tryptamine, qui à son tour serait oxydée en aldéhyde, puis en acide indol-acétique par une amine-oxydase. Mais le tryptophane peut aussi être converti en acide indol-pyruvique par désamination oxydative ou par transamination et l'acide indol-pyruvique est ensuite décarboxylé en acide indol-acétique.

Mais, alors que chez les plantes, aussi bien la tryptamine (White, 1944), que l'acide indol-pyruvique (Stowe et coll., 1953), l'indol-acétaldéhyde (Larsen, 1951), existent à l'état libre et peuvent conduire à la formation de l'acide indol-acétique, la tryptamine ajoutée à nos milieux de culture n'est pas oxydée. D'autre part, la tryptamine n'a été mise en évidence dans le rumen que chez le mouton malade (Dain et coll., 1955).

Lewis (1961) remarque qu'aux pH 4,5, 5,5 et 6,5, les bactéries du rumen ne produisent pas d'amine à partir du tryptophane, alors qu'avec la lysine et l'arginine, il se forme

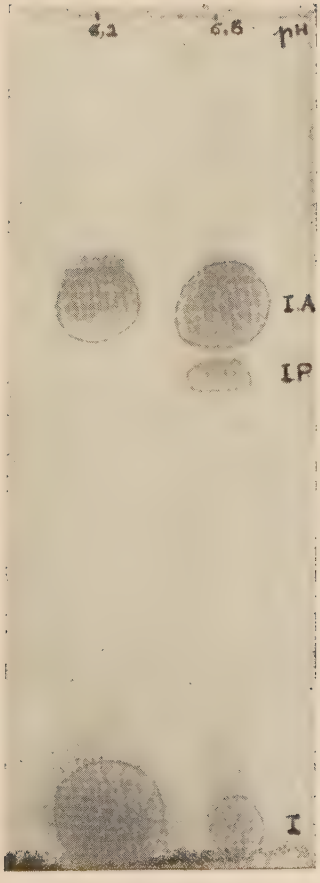


FIG. 24

Influence du pH sur la formation des acides indol-acétique, indol-propionique et de l'indol à partir du tryptophane

respectivement la cadavérine et la putrescine. Nous opterons donc pour le second mécanisme, c'est-à-dire le passage par l'acide indol-pyruvique, chez les bactéries du rumen. Le pH optimal de cette réaction est aux environs de 7 (entre 6,8 et 7,2).

2. *L'acide indol-propionique*

L'acide indol-propionique résulte de la désamination réductrice du tryptophane, ce que confirme sa formation optimale qui est à pH 7,5 (fig. 24). Cet acide a également été mis en évidence dans le tube digestif des Mammifères.

D'autre part, on sait que *Clostridium sporogenes* réduit le tryptophane en acide indol-propionique; cette réduction serait couplée avec l'oxydation d'une seconde molécule de tryptophane en acide indol-pyruvique, puis indol-acétique (Stadtman, 1955).

2 tryptophane ⟶ 1 indol-propionique + 1 indol-acétique + 2 NH_3 + 1 CO_2.

Or, *Cl. sporogenes* a déjà été décrit dans le rumen. On peut donc penser qu'une partie des acides indol-acétique et indol-propionique peut provenir d'une réaction de ce type.

3. *L'acide hydroxy-5-indol-acétique*

Il est moins fréquent sur nos chromatogrammes que les autres composés et toujours en très petite quantité; il peut provenir soit de l'hydroxylation du tryptophane, soit de l'hydroxylation de l'acide indol-acétique. *Chromobacterium violaceum* convertit le tryptophane en hydroxy-5-tryptophane (Mitoma et coll., 1955).

4. *Le scatol*

C'est un produit bien connu de la putréfaction. Lewis (1961) l'a mis en évidence dans la liqueur du rumen. Nous n'avons observé sa formation avec des suspensions lavées qu'en présence de maltose. Il doit provenir de la décarboxylation de l'acide indol-acétique.

5. *L'indol*

Il y a longtemps que l'indol a été identifié dans la putréfaction des matières protéiques. Hopkins et Cole (1903), peu après leur découverte du tryptophane, étudièrent sa dégradation par *Escherichia coli*. Ils mirent en évidence de l'indol et de l'acide indol-acétique en milieu aérobie et de l'acide indol-propionique en milieu anaérobie. Depuis, la formation

de l'indol est largement utilisée pour la différenciation des bactéries et, en particulier, pour le diagnostic des coliformes.

La formation de l'indol a longtemps été expliquée par raccourcissements successifs de la chaîne latérale du tryptophane, par passages à l'acide indol-pyruvique ou indol-propionique, à l'acide indol-acétique, à l'acide indol-carboxylique et à l'indol.

Mais la formation directe de l'indol par coupure de la chaîne latérale du tryptophane devint évidente avec les travaux de Woods (1935) et de Happold et Hoyle (1935). L'enzyme est la *tryptophanase*.

Woods en donna la définition suivante : « c'est un complexe enzymatique de *E. coli* qui induit et catalyse la production d'indol à partir du tryptophane avec des préparations de bactéries non vivantes et avec consommation de 5 O_2 ».

Mais Wood, Gunsalus et Umbreit (1947) montrent avec des extraits partiellement purifiés de *E. coli* qu'il y a formation d'indol, d'acide pyruvique et de NH_3 sans consommation de O_2, et donnent une nouvelle définition : « la tryptophanase est un enzyme capable d'induire la formation d'indol, de pyruvate et d'ammoniac en quantités équimoléculaires à partir du tryptophane, sans consommation de O_2 et avec le phosphate de pyridoxal comme cofacteur ».

Tryptophane Indol

Cette réaction est irréversible; en effet, l'enzyme synthétisant est distinct de la tryptophanase, bien que le cofacteur soit le même: la biosynthèse du tryptophane se fait à partir de l'indol et de la sérine.

Une étude de l'influence du pH sur la formation de l'indol (fig. 24) nous a montré deux optimums : l'un à pH 6,2, l'autre à pH 7,5. Or la tryptophanase d'*E. coli* a son optimum d'action à pH 7,5. Nous avons vérifié que l'acide indol-acétique n'était pas métabolisé à de tels pH. On peut donc penser que seule la tryptophanase entre en jeu dans la formation de l'indol et que ces deux optimums correspondent à des espèces différentes de bactéries.

Le mécanisme de ces réactions est confirmé, comme nous le montrerons plus loin, par l'étude des dégagements gazeux de CO_2 à l'appareil de Warburg et le dosage de l'azote ammoniacal.

Etude de l'activité tryptophanasique des bactéries du rumen

Il nous a paru intéressant de pousser plus loin nos investigations sur l'activité tryptophanasique des bactéries du rumen. Nous avons donc étudié la *tryptophanase* sur des poudres acétoniques de bactéries du rumen, flore globale et souches pures, pour connaître la répartition et l'importance de l'enzyme dans le contenu du rumen. Plusieurs espèces de bactéries sont, en effet, capables de produire une tryptophanase. Or, c'est un fait bien connu, que les propriétés d'un même enzyme ne sont pas nécessairement identiques d'une espèce à l'autre. L'existence de deux pH optimums : l'un 7,5, qui est celui d'*E. coli*, l'autre jamais encore signalé, 6,2, en est une preuve.

La préparation du matériel enzymatique a été décrite dans le chapitre des techniques; nous ajouterons ici quelques précisions : les poudres acétoniques sont préparées à partir de cultures qui ont préalablement été repiquées dans un milieu inducteur, selon le protocole expérimental de Wood et coll. (1947) devenu classique. Cependant, pour augmenter l'activité enzymatique de la flore mixte du rumen, nous avons effectué deux et trois repiquages successifs dans ce milieu.

Nous appellerons A, la poudre acétonique obtenue à partir de bactéries repiquées une fois dans le milieu inducteur.

B, la poudre acétonique obtenue à partir de bactéries repiquées deux fois dans le milieu inducteur.

C, la poudre acétonique obtenue à partir de bactéries repiquées trois fois dans le milieu inducteur.

Nous allons maintenant déterminer *les conditions d'action de l'enzyme.*

1° Conditions d'action de l'enzyme

L'estimation de la teneur en tryptophanase de la flore du rumen peut être obtenue en déterminant la vitesse de réaction enzymatique. Pour que les résultats soient corrects il faut se placer dans des conditions telles que les activités mesurées soient directement proportionnelles à la quantité

de matériel utilisé. Cette proportionnalité n'est respectée que si l'on tient compte des facteurs qui interviennent dans le processus : pH, température, concentrations en substrat et en enzyme, durée d'action.

a) *Etude du pH*

On utilise le tampon phosphates de Sörensen, dont on fait varier le pH pour déterminer la zone où la réaction se fait dans les meilleures conditions.

Les résultats expérimentaux figurent dans le tableau XXII.

TABLEAU XXII

pH	5,2	5,6	6,2	6,6	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10
D.O. x 10^2	5,7	2,7	11	16	17,5	19	18	17	16	14	3,2
indol en μg	2,3	3,1	5	7,5	8,1	8,8	8,4	7,8	7,5	6,5	0,6

2 mg de poudre acétonique A. Température : 37°C; pH 7,5. Durée de l'expérience : 30 minutes.

pH	6,6	6,8	7	7,2	7,4	7.6	7,8	8	8,2	8,4	8,6	9
D.O. x 10^2	19	23	24	25	30	30	28	26	26	23,5	23	21
indol en μg	8,8	10,8	11,3	11,8	14,2	14,2	13,2	12,3	12,3	11	10,8	10

2 mg de poudre acétonique C. Température : 37°C. Durée de l'expérience : 30 minutes.

L'activité enzymatique se manifeste entre les pH 5 et 10. La courbe (fig. 25 *a*) présente l'allure classique d'une courbe en cloche avec un optimum à pH 7,5. On remarque que l'activité enzymatique décroît plus lentement du côté alcalin de la courbe.

b) *Etude de la concentration en substrat*

Les résultats sont consignés dans le tableau XXIII.

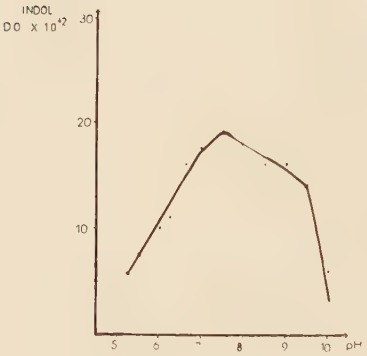
TABLEAU XXIII

CONCENTRATIONS EN TRYPTOPHANE	M/8000	M/4000	M/2000	M/1000	M/500	M/400	M/300	M/200
D.O. x 10^2	1,2	1,8	2,5	3,8	4,5	5	5,8	5,8
indol en μg				1,3	1,8	2	2,4	2,4

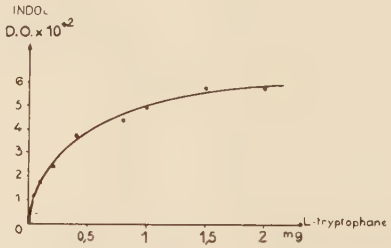
2 mg de poudre acétonique A. Température : 37°C. Durée de l'expérience : 30 minutes. pH 7,5.

FIG. 25

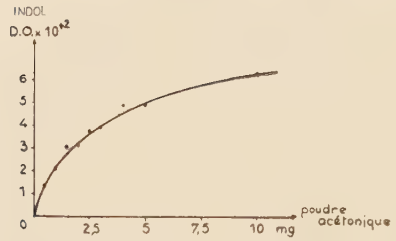
Conditions d'action de la tryptophanase des bactéries du rumen



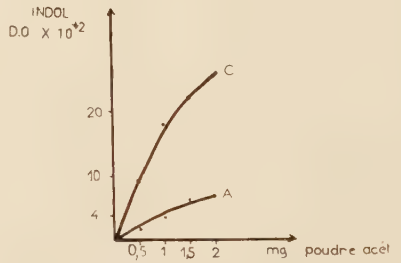
a) Etude du pH



b) Etude de la concentration en substrat



c) Etude de la concentration en enzyme.



d) Comparaison des concentrations en enzyme des poudres acétoniques de bactéries repiquées 1 fois (A) et 3 fois (C) dans le milieu inducteur.

On constate que l'indol formé est identique pour les concentrations de M/300 et M/200 (fig. 25 *b*). Pour la suite des expériences on retiendra que M/300 représente la saturation de l'enzyme en substrat et on opèrera avec une solution de tryptophane initialement M/30.

c) *Etude de la concentration en enzyme*

Pour les quantités inférieures à 5 mg, on utilise une suspension de poudre acétonique dans le tampon (40 mg dans 16 ml) et on pipette le volume correspondant à la concentration à étudier.

Les résultats des mesures expérimentales figurent dans le tableau XXIV et sur la figure 25 *c*.

TABLEAU XXIV

Poids de poudre acétonique en mg	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	5	10
D.O. x 10^2	1,4	2,2	3,1	3,2	3,8	4	5	5	6,4
indol en μg				1,1	1,3	1,5	2	2	2,8

Température : 37°C; pH 7,5; durée de l'expérience : 30 minutes.

Dans le tableau XXV, on compare les concentrations en enzyme de poudres acétoniques de bactéries de rumen repiquées une fois (A) et trois fois (C) dans le milieu inducteur (fig. 25 *d*).

TABLEAU XXV

Poids de poudre acétonique en mg		0,5	1	1,5	2
D.O. x 10^2	A	1,8	3,8	6,5	7
	C	9,5	18	22	26
indol en μg	A	—	1,3	2,8	3
	C	4,2	8,4	10,3	12,3

Température : 37°C; pH 7,5; durée de l'expérience : 30 minutes.

Pour des valeurs inférieures à 1,5 mg, la quantité d'indol formée en 30 minutes varie sensiblement de façon linéaire avec le poids des bactéries mises en expériences (fig. 25 *c* et 25 *d*). Pour les études quantitatives, il faut opérer dans des conditions telles que les activités mesurées soient directement proportionnelles à la quantité du matériel enzymatique. On retiendra donc ici la valeur de 1 mg pour la détermination des unités enzymatiques.

d) *Etude cinétique de la réaction*

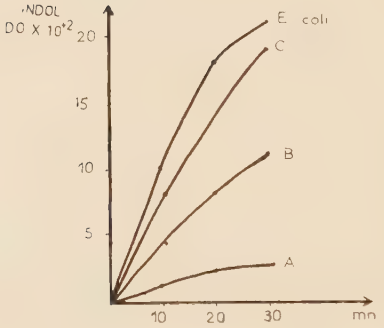
Wood, Gunsalus et Umbreit (1947) ont décrit la cinétique de la dégradation du tryptophane par la tryptophanase

d'*Escherichia coli*. Il n'y a pas de période initiale d'induction, la réaction démarre immédiatement et sa vitesse diminue rapidement avec le temps, car l'indol qui s'accumule dans le milieu est inhibiteur de la réaction. Le tryptophane dégradé ne donne pas une fonction linéaire au-dessus de 8 à 10 μg d'indol formé par 2 ml de milieu (Colowick, Kaplan).

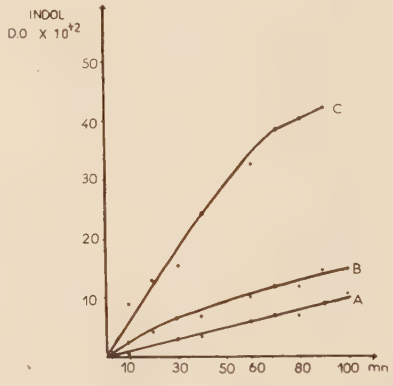
Les graphiques 26 *a* et 26 *b* illustrent la cinétique de la réaction pour les poudres A, B, C et *Escherichia coli*.

Fig. 26

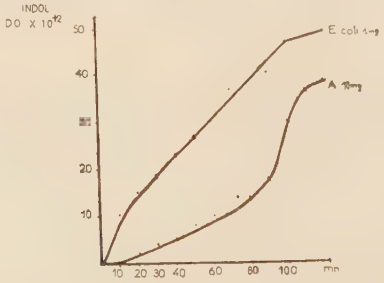
Etude cinétique de la réaction enzymatique



a) Comparaison des poudres acétoniques A, B et C avec celle d'*E. coli* (1 mg).



b) Influence de la durée de l'expérience.



c) Influence de la concentration en enzyme.

La courbe fait penser au début d'une réaction classique si on se limite à une durée de 30 minutes (fig. 26 *a*), mais si l'on prolonge l'expérience dans le temps, jusqu'à 100 minutes,

après un démarrage rapide la réaction prend une vitesse constante et la courbe est une droite (fig. 26 *b*).

2° Détermination de l'activité spécifique

Les résultats mentionnés précédemment ont permis de définir les facteurs expérimentaux requis pour l'étude quantitative des activités enzymatiques.

Nous rappellerons brièvement les conditions retenues :

température : 37°C;

— tampon phosphates de Sörensen, pH 7,5;

— solution de tryptophane M/30;

— matériel enzymatique : 1 mg;

— durée de l'expérimentation : 20 minutes.

On définira l'unité tryptophanase comme la quantité d'enzyme qui, dans nos conditions expérimentales, conduit à la formation de 1 μg d'indol en 20 minutes.

L'activité spécifique sera exprimée en unités enzymatiques par mg de poids sec.

Les résultats sont consignés dans le tableau XXVI.

TABLEAU XXVI

ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES DES POUDRES ACÉTONIQUES					
A	B	C	E. COLI	FORME ATYPIQUE	FORME MIXTE
0,5	1,2	3,5	7,5	5,5	6
1	2,7	5,5			
0,8	2,2	5			
0,8	2	4,5			
0,5	1,5	3,8			
1					
1,2					
0,6					
0,7					
0,6					

Dans nos conditions expérimentales, l'activité spécifique de la flore du rumen varie de 0,5 à 1,2 pour la poudre A, de 1,2 à 2,7 pour la poudre B et de 3,5 à 5,5 pour la poudre C. Elle est donc deux fois plus élevée pour la poudre B et cinq fois plus forte pour la poudre C. L'activité enzymatique des coliformes isolés du rumen s'avère cinq à dix fois plus importante.

Puisque la poudre A a une activité spécifique dix fois plus faible que celle d'une préparation d'*E. coli,* nous avons essayé de comparer la cinétique de la réaction de 10 mg de poudre A et de 1 mg de poudre d'*E. coli* pendant 120 minutes. Le graphique 26 *c* nous montre que la courbe d'*E. coli* est une droite entre 20 et 100 minutes. Par contre, la courbe A a une allure particulière, celle d'une exponentielle : il y a une période d'induction assez longue (80 minutes), puis la réaction démarre brusquement (entre 80 et 100 minutes), enfin sa vitesse diminue. Une trop grande quantité de substrat freine la réaction, mais pendant un certain temps seulement.

Il est certain que pour tirer des conclusions rigoureuses de ces premiers résultats, il faudrait expérimenter avec des extraits enzymatiques purifiés, les préparations acétoniques pouvant contenir une série d'effecteurs, d'inhibiteurs, et d'anti-inhibiteurs qui agiraient en fonction de leurs concentrations et de celles des métabolites formés.

3° Etude de l'influence des glucides

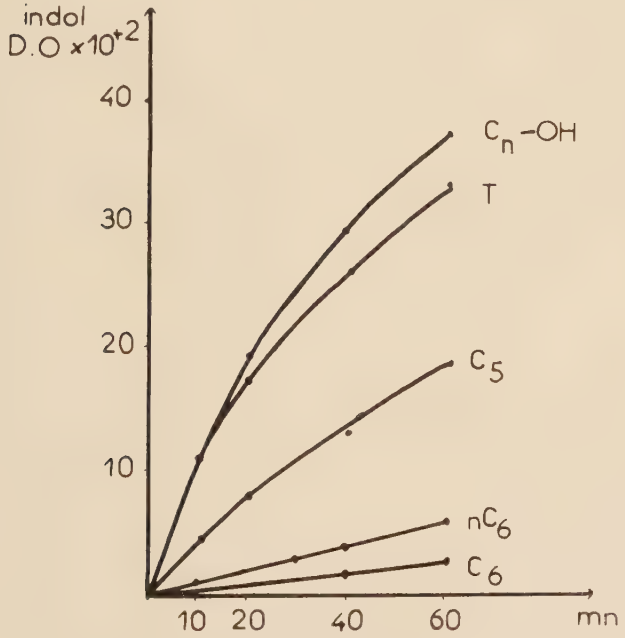
En 1936, Happold et Hoyle constatent que des cultures d'*Escherichia coli* qui ont poussé en présence de glucose sont inaptes à produire de l'indol. Il nous a paru intéressant de reprendre ces expériences sur les bactéries du rumen et de les compléter par l'étude de l'influence d'autres composés glucidiques.

Nos essais portent sur des oses en C_5 et C_6, sur trois diholosides, le maltose, le saccharose et le cellobiose, sur des sucres réduits : glycérol, sorbitol, mannitol et sur le glucose oxydé : l'acide gluconique.

Les résultats sont illustrés par la fig. 27 et consignés dans le tableau XXVII.

Fig. 27

Influence des glucides sur l'activité de la tryptophanas



Consulter la légende du tableau XXVII

TABLEAU XXVII

Influence des glucides sur l'activité tryptophanasique

TEMPS MINUTES	10	20	40	60
Témoin.	11	17	25,6	33
Arabinose. . . .	4	8	13	19
Xylose.	10	16	24	32
Fructose.	1,3	2	3,2	4,2
Galactose. . . .	0,8	1	1,5	2,5
Glucose.	1	1,3	2	2.6
Mannose. . . .	1	1,5	2,3	2,5
Cellobiose. . .	1	1,5	3,5	5,8
Maltose.	0,8	2	4	6,4
Saccharose. . .	0,8	1,1	3,1	6
Gluconolactone	1,5	2,1	4,5	6,7
Glycérol.	10,5	19,5	29,5	39
Mannitol.	11	18	27,4	35
Sorbitol.	11,5	18,3	28	36

Les résultats sont exprimés en D.O. ($\times 10^2$) et portent sur 1 mg de poudre acétonique C; le troisième repiquage a été fait sur des milieux contenant 1 % de composé glucidique, 1 % de peptones et des sels minéraux.

Discussion

L'activité tryptophanase de la poudre acétonique des bactéries du rumen est de 0,8 en moyenne. Or l'activité d'une telle préparation représente environ les 2/3 de l'activité spécifique présente dans les cellules vivantes. Elle atteint environ le 1/10 de celle d'une souche d'*E. coli* isolée du rumen. Cet écart serait encore plus grand si les bactéries n'étaient pas préalablement incubées dans le milieu inducteur qui favorise la multiplication des coliformes. D'ailleurs, par repiquages successifs dans ce milieu, on augmente progressivement l'activité enzymatique et après le troisième repiquage on obtient une cinétique identique à celle d'un coliforme à l'état pur. On crée ainsi une véritable sélection d'espèces : par la méthode de comptage nous avons vu s'accroître le nombre de germes indologènes de la poudre A à la poudre C.

Nous avons remarqué que la présence de glucose dans le milieu inducteur n'inhibait pas complètement la production d'indol par la préparation de cellules sèches. Or Evans et coll. (1941) ont montré qu'une inhibition complète n'était obtenue que par addition de phénylalanine ou de tyrosine.

Récemment, Scott et Happold (1962) ont énoncé que la L-tyrosine entrerait en compétition avec le L-tryptophane dans le « pool » intrabactérien et gênerait la concentration en L-tryptophane nécessaire pour l'élaboration de la tryptophanase. Non seulement le glucose, mais les sucres en C_6, aldoses ou cétoses, inhibent la formation de l'enzyme, mais ne sont pas inhibiteurs de la réaction enzymatique elle-même. Certains sucres en C_5, tel l'arabinose, suppriment la moitié de l'activité tryptophanase, alors que le xylose est sans effet; les diholosides la réduisent notablement. Le glucose oxydé, l'acide gluconique, est moins inhibiteur que le glucose lui-même, alors que le glucose réduit, le sorbitol ainsi que le mannitol et le glycérol, non seulement ne sont plus inhibiteurs, mais ils semblent exalter le phénomène.

Avec notre matériel enzymatique nous avons trouvé un pH optimum 7,5; nous n'avons pas retrouvé un optimum à pH 6,2 comme avec les bactéries vivantes. Cela provient de la culture préalable des bactéries dans le milieu inducteur qui est aérobie, calqué sur celui d'*E. coli* et qui favorise donc la multiplication des coliformes. Or d'autres espèces signalées dans le rumen sont productrices d'indol, telles certaines Corynébactéries et certains Streptocoques (Bryant, 1959). On peut donc penser que parmi ces espèces, certaines auraient une tryptophanase dont le pH optimum d'action serait à 6,2. Leur isolement et leur étude peuvent faire l'objet d'un travail ultérieur.

ÉTUDE DES ÉCHANGES GAZEUX ACCOMPAGNANT LE CATABOLISME DES ACIDES AMINÉS CYCLIQUES

Nous venons d'étudier les principaux produits du catabolisme des acides aminés cycliques par les bactéries de la panse. On a pu constater que les résultats sont très différents suivant la structure chimique : ainsi les bactéries du rumen sont incapables d'ouvrir le noyau aromatique alors qu'elles ouvrent facilement les cycles pyrrolidine et imidazole. Elles fabriquent à partir de ces derniers des acides gras volatils, tandis qu'à partir des premiers elles produisent des acides aromatiques et indoliques. Ces acides aminés sont donc désaminés et décarboxylés avant ou après ouverture du cycle. Nous avons essayé de confirmer ces mécanismes par la mesure des dégagements de gaz carbonique à l'appareil de Warburg et par le dosage de l'azote ammoniacal.

En plus des six acides aminés cycliques, nous avons étudié

quelques acides aminés aliphatiques (acides aspartique et glutamique, alanine) pour avoir des points de comparaison, ainsi que l'urée.

Protocole expérimental

On introduit 3 µmoles d'acide aminé cyclique dans chaque fiole de Warburg pour 2 ml de suspension bactérienne ou 5 µmoles d'acides aspartique et glutamique, ou bien 20 µmoles d'urée. On arrête la réaction par addition de SO_4H_2 après 4 heures, 8 heures et 24 heures d'incubation.

L'ammoniac qui se trouve sous la forme de $SO_4(NH_4)_2$ est dosé dans une partie aliquote de la liqueur d'incubation des fioles de Warburg. La quantité totale de gaz dégagé est mesurée, diminuée du témoin correspondant et exprimée en µl de CO_2. Le gaz dégagé dans les fioles contenant de la potasse est du méthane (on sait, en effet, que dans la panse les bactéries produisent des quantités presque égales de CO_2 et de CH_4) ; les dégagements dans les fioles avec substrat et dans les fioles témoins ont toujours été identiques, prouvant que le méthane n'est pas un produit du catabolisme des acides aminés étudiés.

Sur le tableau XXVIII, on peut remarquer que les quantités d'ammoniac et de gaz carbonique sont équimoléculaires pour la plupart des amino-acides; l'histidine libère deux molécules d'ammoniac pour une molécule de gaz carbonique; la proline et l'hydroxyproline ne subissent pas de décarboxylation.

Discussion des résultats

L'urée est très rapidement dissociée en CO_2 et NH_3. En une demi-heure, 12,5 µmoles sont dégradées. L'acide aspartique est de tous les acides aminés étudiés celui qui est le plus vite catabolisé (5 µmoles en 4 heures). L'acide glutamique, l'alanine et l'histidine, ont la même cinétique de disparition.

Les acides aminés cycliques, excepté l'histidine, ont un métabolisme beaucoup plus lent. A en juger par les résultats obtenus au Warburg et par les mesures de l'azote ammoniacal, on peut les classer dans l'ordre décroissant suivant : histidine, tryptophane, phénylalanine, tyrosine, proline et hydroxyproline.

Comment expliquer ces résultats :

En ce qui concerne les acides aminés aliphatiques, nos résultats concordent avec ceux de Lewis (1955), de Weller (1957) et de Sirotnak et coll. (1953). Pour les acides cycliques, il faut étudier séparément chaque cas.

TABLEAU XXVIII

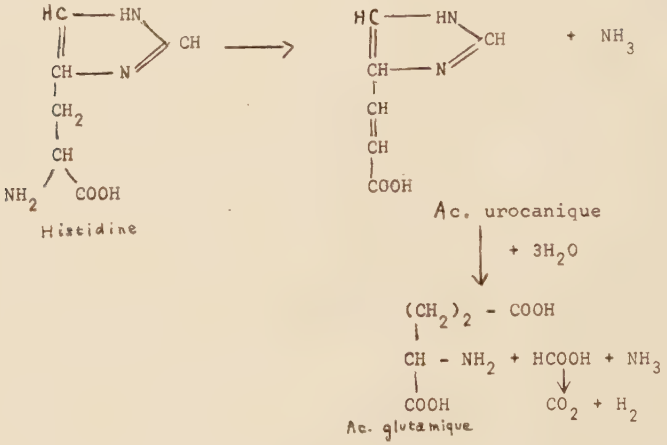
Décarboxylation et désamination de quelques acides aminés et de l'urée par des suspensions lavées de bactéries du rumen

SUBSTRATS	DURÉE DE L'EXPÉRIENCE	CO_2 µmoles	NH_3 µmoles	ACIDES ORGANIQUES FORMÉS
Urée	1/2 h	12,5	25	
(20 µmoles)	1 h	20	49,5	
Acide aspartique (5 µmoles)	4 h	4,9	5	Acide succinique Acide propionique
Acide glutamique	8 h	1,3	—	Acide acétique
(3 µmoles)	24 h	3,1	3,2	Acide butyrique
Alanine	8 h	1,1	—	Acide acétique
(3 µmoles)	24 h	3,1	2,8	
Histidine	8 h	1,4	3	Acide glutamique
(3 µmoles)	24 h	3,4	6,4	
Tryptophane				Indol, acide indol-acétique
(3 µmoles)	24 h	3	2,9	Acide indol-propionique
Phénylalanine (3 µmoles)	24 h	0,8	1	Acide phénylacétique
Tyrosine				Acide p-hydroxyphénylacétique
(3 µmoles)	24 h	0,4	1,6	Acide phénylpropionique
Proline (3 µmoles)	24 h	0	0,4	Acide δ-aminovalérique
Hydroxyproline (3 µmoles)	24 h	0	0,3	Acide δ-amino-γ-hydroxyvalérique

Les témoins ont été déduits de chaque résultat.

L'histidine

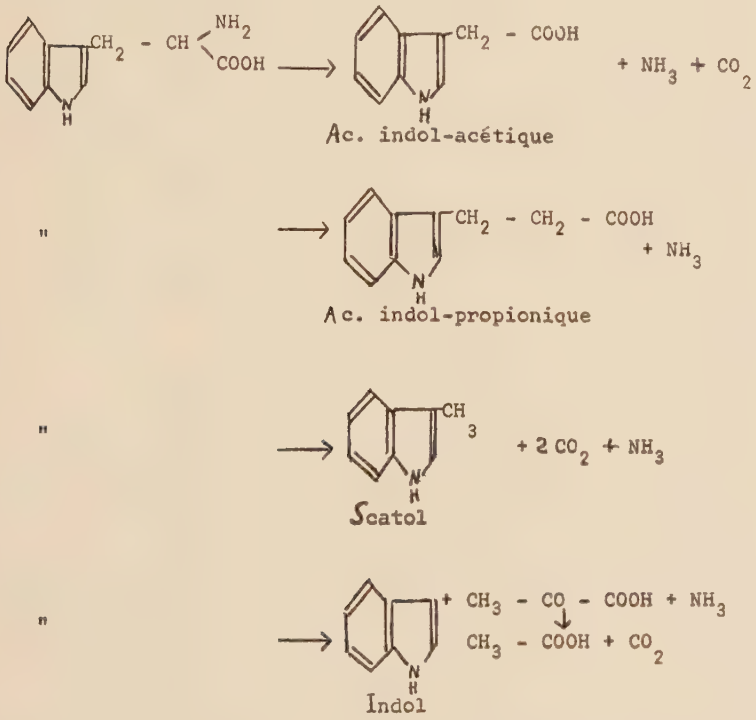
Le cycle imidazole est rapidement ouvert :



Au total, 1 histidine → 1 acide glutamique + 2 NH_3 + CO_2.
Cette équation concorde parfaitement avec nos résultats.

Le tryptophane

D'après les résultats exposés précédemment, les principaux métabolites du tryptophane sont les suivants :



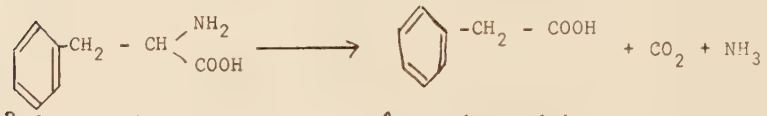
Au total, 4 tryptophane ⟶ 4 composés indoliques + 4 NH_3 + 4 CO_2

L'acide indol-propionique et le scatol sont très irrégulièrement trouvés sur nos chromatogrammes, les deux métabolites les plus importants étant l'indol et l'acide indol-acétique.

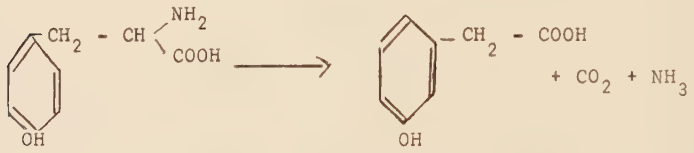
On sait que la tryptophanase transforme le tryptophane en indol, acide pyruvique et ammoniac. Mais l'acide pyruvique est à son tour rapidement décarboxylé en acide acétique par les bactéries du rumen. Il est donc logique de trouver des quantités équimoléculaires de CO_2 et de NH_3.

Phénylalanine et tyrosine

D'après les résultats lus sur le tableau XXVIII, ces deux acides aminés semblent peu décarboxylés et peu désaminés. Or, nous avons vu que ces deux acides aminés sont dégradés par les L-amino-acide-oxydases qui ont besoin d'oxygène moléculaire, totalement absent des fioles de Warburg, pour donner les métabolites suivants :

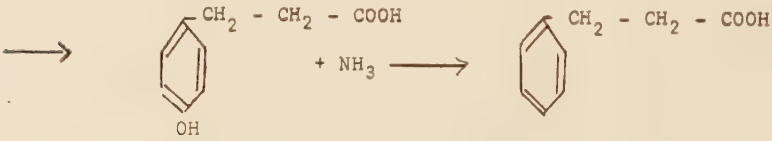


Phénylalanine — Ac. phénylacétique



Tyrosine — Ac. phénylacétique

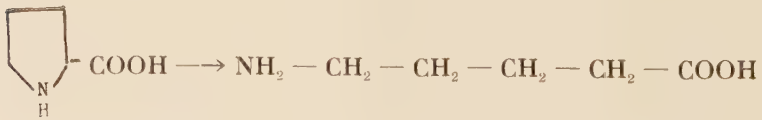
La tyrosine subirait de plus une désamination et, semble-t-il, une déshydroxylation comme nous l'avons discuté plus haut par un mécanisme qui reste à déterminer.



Ac. p-hydroxy-phénylpropionique — Ac. phénylpropionique

Proline et hydroxyproline

Nous avons montré que ces deux acides aminés pouvaient être réduits par les bactéries du rumen, par des processus autres que la réaction de STICKLAND, avec formation d'acide δ-amino-valérique et γ-hydroxy-δ-amino-valérique qui, à leur tour, peuvent être désaminés.



Il est donc normal de n'observer aucun dégagement gazeux dans l'appareil de Warburg.

Ces recherches concernant la formation de gaz carbonique et d'ammoniac à partir des acides aminés cycliques viennent compléter et confirmer les premiers résultats obtenus par chromatographie.

Ainsi le catabolisme des acides aminés cycliques ne peut être mis en évidence que par des mesures de 24 heures. Sirotnak et coll. (1953), puis Lewis (1955), n'avaient pas pu observer ce phénomène parce que leurs expériences étaient de trop courte durée (2 heures).

Et l'on comprend la conclusion un peu hâtive de Sirotnak et coll. évoquant la nature uniquement anabolique des processus concernant ces amino-acides, puisqu'ils n'utilisaient que les acides gras volatils comme critère de leur catabolisme.

II. ÉTUDE DE L'ANABOLISME DES ACIDES AMINÉS CYCLIQUES

De nos expériences précédentes, il résulte que les acides aminés cycliques pris individuellement sont relativement peu dégradés par les bactéries du rumen.

Il est certain que les acides aminés sont plus vite utilisés s'ils sont donnés par couple ou en mélange. El-Shazly et Lewis ont signalé qu'avec le couple alanine-proline la quantité d'ammoniac dégagée est plus importante que les quantités additionnées provenant de l'alanine et de la proline incubées séparément. Avec un hydrolysat de caséine, El-Shazly note la disparition rapide et complète de la phénylalanine, de la tyrosine et de la proline.

D'autre part, nous avons remarqué que le maltose favorisait l'utilisation des acides aminés. Raynaud (1959) fait des constatations semblables en étudiant le devenir d'un mélange de huit acides aminés dans des expériences *in vivo* et *in vitro* avec des bactéries de rumen. Il établit une discrimination entre les milieux sans glucides et les milieux avec glucides. Les bactéries utilisent « sélectivement » les acides aminés qui leur sont offerts selon la composition du milieu : dans un milieu riche en azote, les bactéries utilisent préférentiellement les acides aminés qui se prêtent le plus facilement à la désamination. Dans un milieu riche en glucides, les acides aminés introduits simultanément dans les cultures disparaissent de façon à peu près identique. Raynaud pense que les acides aminés les moins bien

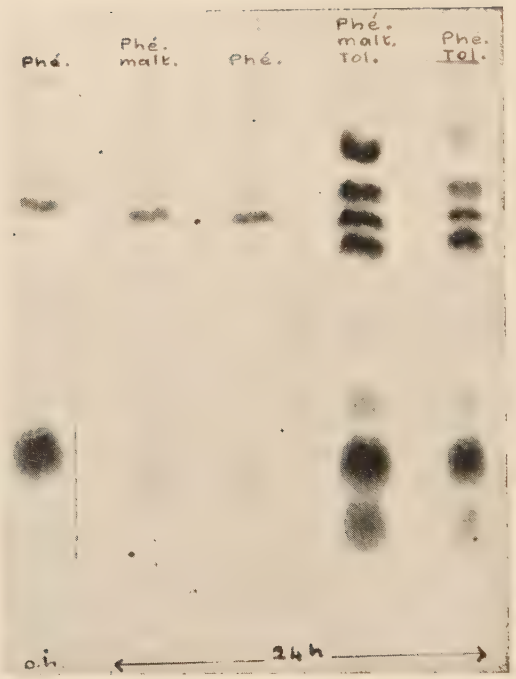


Fig. 28

Les acides aminés libres du « pool » extérieur en fonction de la composition du milieu (influence du toluène).

catabolisés seraient alors directement intégrés dans la molécule protéique.

Il nous a donc paru intéressant de rechercher si tous les acides aminés cycliques dont nous venons d'étudier le catabolisme pouvaient être assimilés directement par les corps bactériens et quel rôle ils jouaient dans la protéosynthèse. Nous avons ainsi été amenée à étudier le « pool » des acides aminés intrabactériens des bactéries de la panse. On sait depuis les expériences de Gale (1947) que les corps bactériens, comme toute cellule vivante, contiennent des acides aminés à l'état libre. La concentration de certains acides aminés à l'intérieur du corps bactérien peut être supérieure à celle du milieu extérieur : Gale a montré que le pouvoir de concentration à travers la paroi cellulaire variait avec les espèces: il a observé les plus fortes valeurs pour certains Staphylocoques dont la concentration en acide glutamique peut atteindre 400 fois celle du milieu extérieur.

Protocole expérimental

Le contenu du rumen d'animaux sacrifiés à l'abattoir est débarrassé des débris végétaux et des protozoaires par filtration et centrifugation. Le filtrat est divisé en plusieurs parties : l'une est analysée immédiatement, les autres sont mises à incuber 7 heures à 39°C :

a) en présence de maltose (0,5 %) ;
b) en présence de peptones (0,25 %) ;
c) en présence de maltose et de peptones (à ces mêmes taux).

Une autre série d'expériences est réalisée en milieu artificiel (tampon phosphates pH 6,8) avec des bactéries lavées :

a) en présence d'un acide aminé cyclique (0,1 mmole %) ;
b) en présence de maltose et d'un acide aminé cyclique.

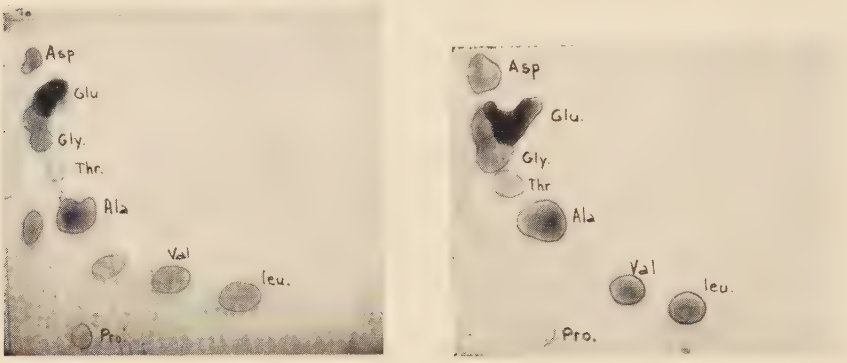
Les bactéries des différentes liqueurs d'incubation sont recueillies, lavées deux fois à l'eau distillée, puis déshydratées à l'acétone et sous vide. Les acides aminés libres sont extraits des bactéries sèches par le procédé de Lindan et Work déjà décrit dans nos techniques.

Résultats

L'analyse chromatographique (fig. 29) nous révèle une quinzaine d'acides aminés. Ce sont, par ordre d'importance décroissante : acide glutamique, alanine, sérine et glycine,

FIG. 29

Les acides aminés intrabactériens



a) avant hydrolyse *b*) après hydrolyse

leucine, valine+méthionine, acide aspartique, acides aminés basiques (histidine + lysine + arginine), proline, thréonine, phénylalanine, acide α-amino-butyrique, tyrosine, acide γ-amino-butyrique. Tous ces acides aminés ne sont pas toujours présents sur chaque chromatogramme. Ainsi manquent parfois les acides α- et γ-aminobutyrique, la tyrosine, la phénylalanine.

Les acides aminés libres, dosés colorimétriquement et exprimés en acide glutamique, représentent 0,2 à 0,5 % du poids sec des bactéries. L'hydrolyse de l'extrait aqueux double à peu près cette valeur (0,3 à 1 %) ce qui prouve l'existence de quelques peptides solubles. (Cet extrait ne contient pas de protides.) L'azote total de cet extrait équivaut à 0,15 % du poids sec des bactéries.

Les acides aminés libres ont nécessairement une double origine: *exogène* par absorption des acides aminés du milieu ambiant, *endogène* par hydrolyse des protéines de structure. *L'absorption* des amino-acides exogènes par la cellule est une étape préliminaire essentielle de la protéosynthèse.

En faisant varier la composition du milieu nutritif nous avons abordé l'étude du passage des acides aminés à travers la membrane cellulaire.

Un exemple des résultats obtenus est consigné dans le tableau XXIX.

TABLEAU XXIX

	MILIEU NATUREL (jus de rumen)	MILIEU ARTIFICIEL (tampon phosphates)
Temps 0	246	246
Incubation 7 heures :		
+ maltose	225	161
+ peptones	285	469
+ maltose + peptones	515	415

Les résultats sont exprimés en µg d'acide glutamique p. 100 mg de bactéries (poids sec).

Il ressort de nos expériences les conclusions suivantes :

1° Si le milieu est bien équilibré *(maltose + peptones)*, la croissance bactérienne est maximale et les amino-acides internes sont abondants. Le maltose favorise nettement le passage des acides aminés à l'intérieur de la cellule.

2° Si le milieu est riche en glucides (apport de *maltose* seul) il y a peu d'amino-acides libres. C'est que les bactéries ont eu besoin de ces acides aminés pour édifier leurs propres protéines.

3° Par contre, avec un apport de protéines seules *(peptones)* on observe des différences marquées entre les expériences réalisées en milieu naturel et en milieu artificiel. En effet, la richesse initiale du jus de rumen en glucides semble conditionner la multiplication des bactéries et l'importance du « pool ». En milieu artificiel, le nombre de bactéries diminue; il y a autolyse et l'on voit augmenter la quantité d'acides aminés libres. Dans ce cas, la privation totale de glucides entraîne une protéolyse très notable et l'on observe en même temps une forte production d'ammoniac.

4° Les acides aminés cycliques, que leur noyau soit à 3, 4, 6 ou 8 atomes de carbone, sont absorbés directement par les corps bactériens : en effet, en présence d'un aliment énergétique, en l'occurence le maltose, on les retrouve dans le « pool » intrabactérien. On consultera le chromatogramme (fig. 15) relatif au passage de la phénylalanine dans le « pool » intracellulaire.

5° En présence de toluène, les acides aminés cycliques pénètrent facilement dans les corps bactériens même s'il n'y a pas de glucides dans le milieu (fig. 15). Et, vice-versa,

les acides aminés qui sont absents du milieu de culture diffusent du « pool » intérieur dans le milieu extérieur (fig. 28). On sait, en effet, que les protéases ne sont pas inhibées par le toluène, aussi assiste-t-on peu à peu à une véritable fuite d'acides aminés endogènes dans le milieu extérieur. Le maltose semble renforcer cette action et agir en synergie avec le toluène comme on peut le constater sur le chromatogramme. La membrane cellulaire semble fonctionner comme une simple membrane osmotique en présence de toluène. En effet, le toluène provoque des modifications de perméabilité de la membrane bactérienne sans doute par dissolution des lipides de la membrane cytoplasmique.

Nos résultats semblent confirmer que la cellule doit disposer d'une source énergétique pour assurer le transfert de la plupart des acides aminés à travers la membrane cellulaire : ceci a été vérifié particulièrement pour l'acide glutamique (Gale, 1947), la leucine, la valine (Mandelstam, 1958) et les acides aminés cycliques que nous avons récemment étudiés; par contre, Gale (1947) démontre que la lysine passe dans la cellule sans apport énergétique. Plusieurs théories sur le mécanisme d'absorption des aminoacides ont été émises. La plus séduisante est la théorie des « *perméases* » de Cohen et Monod (1957) qui fait appel à un mécanisme catalytique de concentration.

Ces acides aminés libres sont utilisés dans les processus de protéosynthèse. Ce phénomène a pu être suivi à l'aide de corps marqués. Britten et coll. (1955) ont démontré que la ^{14}C proline était absorbée par des suspensions *d'Escherichia coli* et que la radioactivité des protéines pendant la croissance était directement proportionnelle à la quantité de proline marquée. Par ailleurs, Mandelstam (1958) a montré le passage de la ^{14}C valine dans le « pool » intracellulaire.

Le mécanisme de la synthèse protéique n'est pas encore complètement élucidé. On sait depuis 1959 que le site électif d'incorporation des acides aminés chez les bactéries est non seulement la membrane mais également les ribosomes, tout comme dans les tissus animaux (Mc Quillen et coll., 1959). D'autre part, la formation de liaisons peptidiques est limitée par la quantité de ARN présent. Or les cellules bactériennes sont riches en ARN, ce qui est le signe d'une grande activité protéogénétique.

Ainsi la nature et la teneur des acides aminés libres

varient selon le milieu nutritif alors que les protéines de structure ont une composition constante (fig. 30) (Weller,

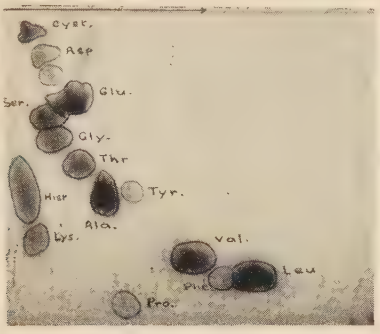


Fig. 30

Les acides aminés d'un hydrolysat de protéines bactériennes

1957). Ceci témoigne de l'importance et de la grande activité du « pool » : il traduit l'adaptation de la cellule au milieu ambiant pour maintenir constante la composition des protéines de structure.

III. ÉTUDE DES AGENTS DE LA DÉGRADATION DES ACIDES AMINÉS CYCLIQUES

Après avoir étudié le métabolisme des acides aminés cycliques (catabolisme et anabolisme) il était logique de rechercher les microorganismes qui peuvent jouer un rôle dans la dégradation de ces amino-acides. Pour cela nous avons utilisé la méthode de culture par enrichissement du milieu. C'est-à-dire le repiquage successif des germes dans un milieu enrichi en acide aminé. Il est certain que par cette méthode on crée une sélection d'espèces; c'est ce que nous avons essayé de montrer en suivant la croissance des bactéries, cultivées sur un seul acide aminé comme source d'azote, par l'utilisation du biophotomètre Bonet et Maury et en déterminant les espèces capables de se développer sur de tels milieux.

Pour la clarté de l'exposé, nous diviserons ce paragraphe en deux parties.

1° Influence, sur la croissance des bactéries, des acides aminés cycliques fournis individuellement comme seule source d'azote

Depuis les travaux de Loosli et coll. (1949), on sait qu'aucun acide aminé n'est indispensable pour *l'ensemble* des bactéries du rumen et que celles-ci sont capables de synthétiser leurs propres protéines à partir de l'azote ammoniacal. On pouvait donc se demander si chaque acide aminé utilisé seul est apte à favoriser la prolifération bactérienne (1).

Principe de cette étude

Les bactéries isolées du contenu du rumen de moutons porteurs de fistules sont ensemencées dans les milieux de culture placés dans les cuves du biophotomètre Bonet et Maury. Les variations du pourcentage de transmission lumineuse de ces milieux pendant la multiplication bactérienne sont enregistrées automatiquement par l'appareil. Les courbes obtenues sont utilisées pour l'interprétation des résultats.

Protocole expérimental

On prépare une suspension de bactéries dans le tampon phosphates pH 6,8 de telle sorte que 8 ml de cette suspension placés dans une cuve du biophotomètre de 1 cm d'épaisseur laissent passer 50 % de la lumière incidente.

A 8 ml de cette suspension bactérienne ainsi standardisée on ajoute :

— 20 ml de solution tampon phosphates,
— 14 ml de solution minérale tamponnée,
— 7 ml de solution de maltose à 8 %.

La suspension ainsi préparée est homogénéisée et placée à raison de 7 ml dans chacune des six cuves du biophotomètre. On ajoute 1 ml de la solution de l'acide aminé dont la concentration en azote est de 0,8 mg par ml. Les concentrations finales du maltose et de l'azote dans chaque cuve sont respectivement de 1 g % et de 0,01 g %.

Cette façon de procéder permet d'avoir, au cours de chaque expérience, la même concentration initiale en bactéries, c'est-à-dire d'opérer avec le même pourcentage initial de transmission lumineuse.

---

(1) Ce travail s'institue dans le cadre d'une étude générale de l'influence des acides aminés sur le développement des bactéries du rumen, entreprise dans le laboratoire du Professeur Raynaud. Pour plus de détails, voir le mémoire de Beauville et coll. (1961).

Les cuves, ainsi préparées, sont introduites dans l'enceinte thermostatique, préalablement portée à 39°C, pour une durée de 24 heures.

Résultats

En dehors de ces six acides aminés cycliques nous avons examiné à titre comparatif le rôle des acides aspartique et glutamique, de l'alanine, de l'urée, du carbonate et du sulfate d'ammonium. Nous rapporterons ici les résultats les concernant.

Nous avons fait un minimum de neuf expériences pour chaque acide aminé. Les figures 31 et 32 représentent des courbes types obtenues au cours de cette expérimentation. Le simple examen de ces courbes nous permet de constater que les acides aminés n'ont pas tous, pris séparément, la même valeur pour la croissance des bactéries du rumen.

Discussion des résultats

D'après nos résultats sur la désamination des acides aminés (tableau XXVIII), il semble que l'intensité de la multiplication des bactéries du rumen soit liée à l'aptitude de ces acides aminés à libérer de l'azote ammoniacal. Ainsi avec l'urée ou le simple carbonate d'ammonium, la croissance est maximale, de l'ordre de celle obtenue avec l'acide aspartique, acide rapidement désaminé.

Il n'est donc pas étonnant que les acides aminés cycliques, dont la cinétique de dégradation est lente par rapport à celle des acides aminés aliphatiques, se montrent peu favorables à la croissance de l'ensemble des bactéries du rumen.

Cependant d'autres facteurs inhérents à l'acide aminé peuvent intervenir : sa toxicité qui est fonction de sa concentration, ou son caractère indispensable pour certaines souches.

D'autre part, certaines variations des conditions de vie de la microflore peuvent la modifier au point d'entraîner une bonne utilisation des acides aminés cycliques, et par suite une bonne croissance de la culture. Nous citerons deux exemples pour illustrer ce propos.

— Si l'on cultive les bactéries du rumen par la méthode d'enrichissement du milieu en présence d'un seul acide aminé cyclique, les bactéries provenant du troisième repiquage présentent une croissance maximale avec cet aminoacide comme seule source d'azote. Le graphique 33 montre

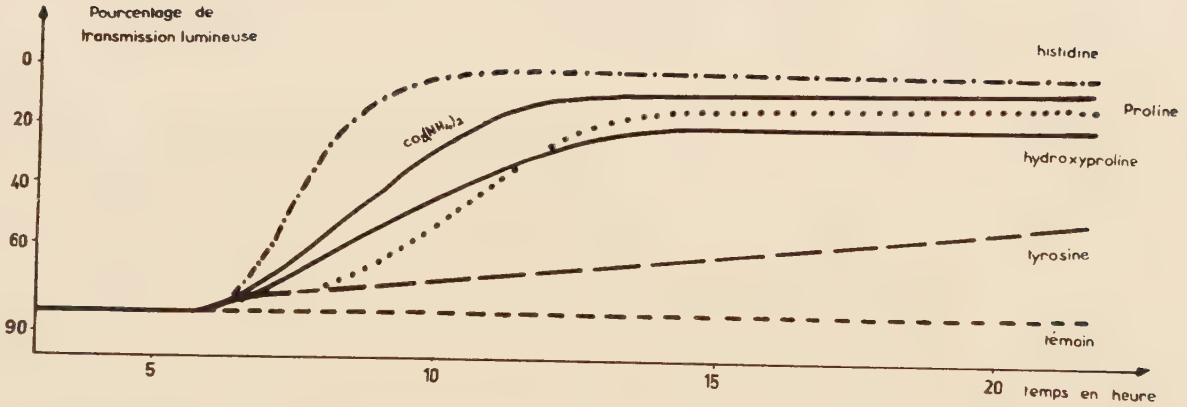


FIG. 31
Croissances des bactéries du rumen mesurées au biophotomètre BONET-MAURY en fonction de la source azotée.

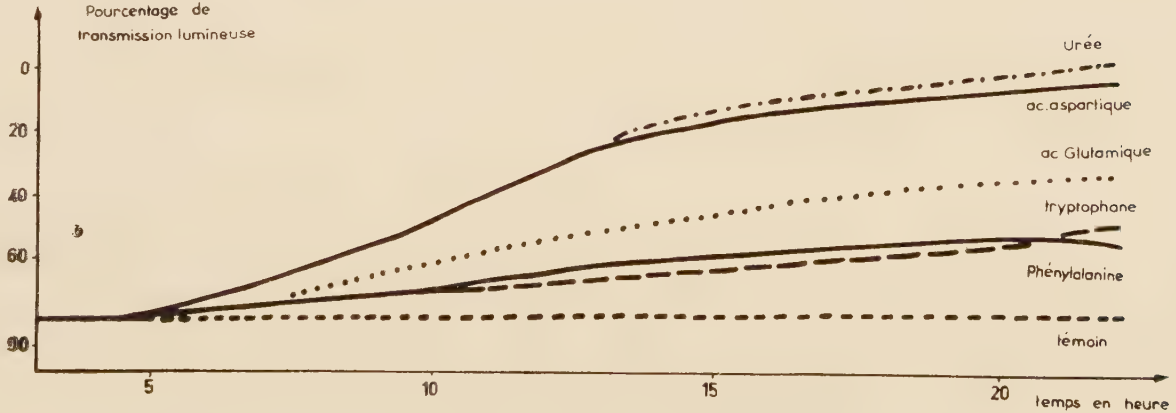


FIG. 32
Croissances des bactéries du rumen mesurées au biophotomètre BONET-MAURY en fonction de la source azotée.

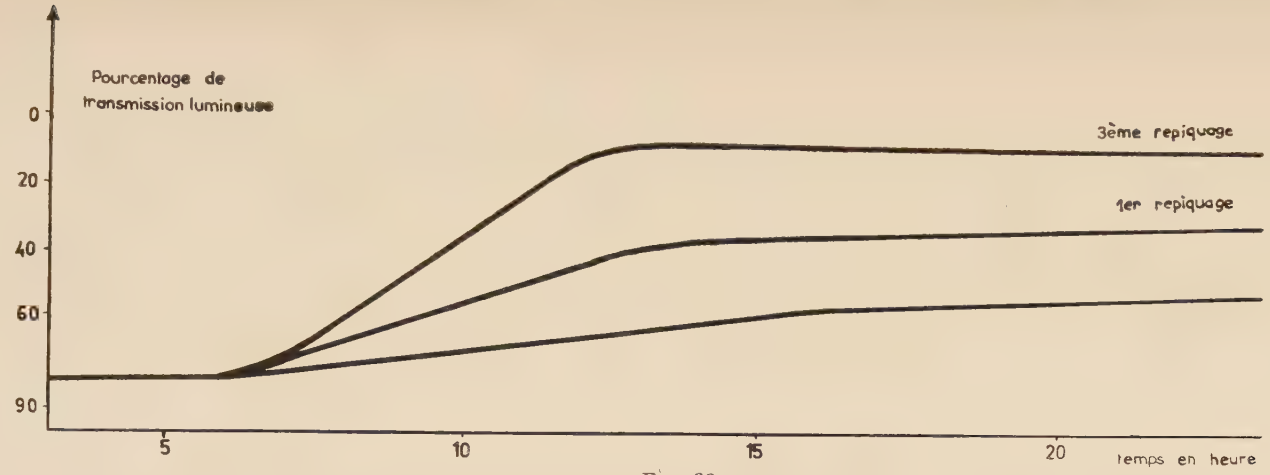


FIG. 33
Influence de la méthode de culture par enrichissement du milieu sur la croissance des bactéries.

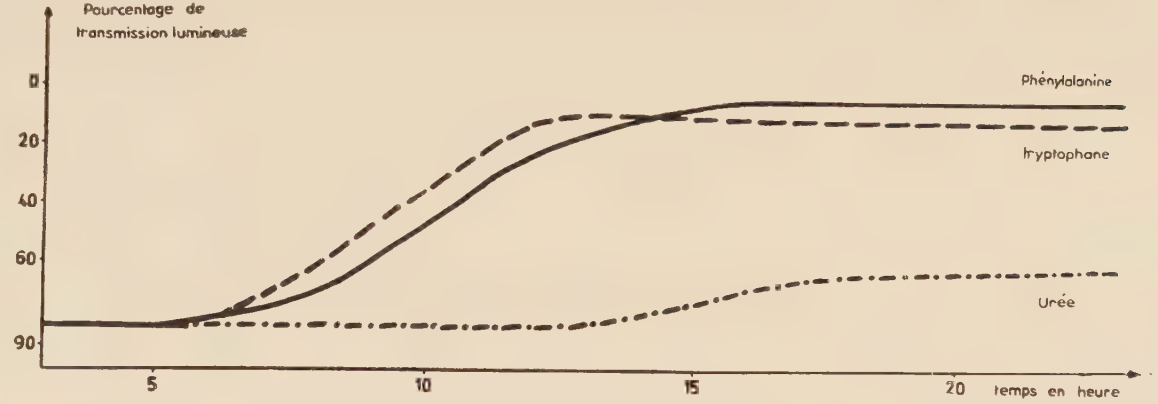


FIG. 34
Variation de la microflore en fonction du milieu extérieur.

bien la progression dans la cinétique des courbes de croissance du premier au troisième repiquage.

— D'autre part, un de nos moutons porteur d'une fistule permanente du rumen a présenté la particularité suivante : les tissus entourant la canule s'étant distendus, il se produisait une perte constante de liquide du rumen. Les bactéries bien isolées à partir de ces digesta secs se montrèrent capables de croître sur nos acides aminés cycliques et, en particulier sur la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane et pas du tout sur l'urée (fig. 34). Une flore anormale s'était développée; profitant d'un milieu qui n'était plus anaérobie strict, les espèces anaérobies facultatives et même aérobies trouvées sur les fourrages avaient, seules, proliféré.

Conclusion

Selon l'influence qu'ils exercent sur la croissance de la microflore normale du rumen, les acides aminés que nous avons étudiés peuvent être classés en trois groupes :

Premier groupe : constitué par les acides aminés les plus actifs, vis-à-vis de la croissance. A ce groupe appartient à côté de l'acide aspartique, *l'histidine*.

Deuxième groupe: constitué par les acides aminés moyennement actifs : *la proline* et *l'hydroxyproline*, l'acide glutamique et l'alanine.

Troisième groupe : renfermant les acides aminés qui sont peu favorables à la croissance des bactéries du rumen. On y trouve les acides aminés à noyau aromatique : *phénylalanine*, *tyrosine* et *tryptophane*.

Il ressort de ces résultats que la structure chimique de l'acide aminé n'intervient que dans la mesure où ces acides se prêtent à la désamination par les bactéries. En effet, la valeur des différents acides aminés dépend de leur aptitude à fournir de l'azote ammoniacal aux bactéries bien que certains d'entre eux puissent être directement intégrés à la molécule protéique après passage dans le « pool » intrabactérien.

D'autre part, en cultivant les bactéries sur un milieu aussi restreint en azote on crée une sélection d'espèces. Nous avons mis à profit cette sélection pour essayer d'isoler les organismes capables de jouer un rôle dans le catabolisme des acides aminés cycliques.

2° Les espèces qui jouent un rôle dans le catabolisme des acides aminés cycliques

Les résultats sur la valeur individuelle des acides aminés cycliques dans les cultures de bactéries du rumen, nous ont amenée à rechercher quelles espèces sont capables de se développer sur de tels milieux et quel rôle elles jouent dans la dégradation de ces acides aminés.

La flore du rumen est extrêmement complexe et a fait l'objet de nombreux travaux de dénombrement et d'identification. Les bactéries cellulolytiques sont les plus nombreuses (10^5 à 10^{10} par ml de liquide de panse), la digestion de la cellulose étant essentielle pour la nutrition du Ruminant; les streptocoques, les lactobacilles sont également parmi les espèces les plus abondamment représentées. Les bactéries protéolytiques ont fait l'objet de récentes études. Appleby (1955) a mis au point une technique pour la détection des colonies protéolytiques : sur caséine l'organisme le plus fréquent est *Bacillus licheniformis*. Récemment Bladen, Bryant et Doestch (1961) ont recherché les bactéries capables de produire de l'ammoniac à partir d'un hydrolysat de protéines. Peu de données concernent les microorganismes qui, pris individuellement, sont spécifiquement et activement engagés dans le catabolisme (désamination, décarboxylation, ouverture du cycle) des acides aminés. Peu d'espèces bactériennes ont été impliquées : *Selenomonas ruminantium* (Bryant, 1956) et *Bacteroides ruminicola* (Bryant et coll., 1958) catabolisent respectivement la cystéine et un hydrolysat de caséine. Lewis et Elsden (1955) montrent que *Peptostreptococcus elsdenii* (LC coccus) fermente la L-sérine, la L-thréonine et la L-cystéine avec production d'ammoniac, d'acides volatils, de H_2 et de CO_2.

A notre tour, nous avons essayé de cultiver, d'isoler et d'identifier les bactéries capables de dégrader les acides aminés cycliques.

Dans le chapitre des techniques on trouvera le protocole expérimental relatif à l'isolement et à l'identification de ces microorganismes.

Voici les *résultats* que nous avons obtenus :

Les bactéries isolées appartiennent pour la plupart au groupe des anaérobies facultatifs : sur tous les milieux renfermant les divers acides aminés étudiés, nous avons isolé

des Coliformes (famille des Enterobacteriaceæ).

Morphologie et type respiratoire :

Ce sont des bâtonnets ovalaires à Gram négatif dont les formes courtes présentent la coloration bipolaire. Ils sont mobiles ou immobiles, anaérobies facultatifs.

Caractères culturaux :

En *gélose profonde* on observe des colonies lenticulaires qui poussent sur toute la hauteur du tube, avec ou sans formation de gaz; sur *gélose inclinée* les colonies sont lisses, grasses et blanchâtres.

Caractères biochimiques :

Ces germes sont doués d'un pouvoir fermentatif considérable vis-à-vis des sucres; le saccharose et le lactose servent de caractère différentiel. Mais on les différencie surtout par le « IMVIC » (tableau XXX).

TABLEAU XXX

Diagnostic des coliformes isolés du rumen basé sur le « IMVIC »

	I	M	V	IC	AUTRES CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS	
					Lait	Saccharose
Escherichia coli commune	+	+	0	0	Coagulé	0
Escherichia coli commune	+	+	0	0	0	0
Escherichia coli communior	+	+	0	0	Coagulé	+
Forme atypique	+	+	0	+	0	0
Forme mixte	+	+	+	+	Coagulé	+
Forme mixte	+	0	+	+	0	+
Paracolobactrum aerogenoïdes	0	0	+	+	0	0
Aerobacter aerogenes	0	+	+	+	0	+
Aerobacter aerogenes atypique	0	0	+	+	0	+
Aerobacter cloacae	0	0	+	+	liquéfie la gélatine	

I : réaction de l'indol.
M : réaction au rouge de méthyle.
V : réaction de Voges Proskauer (formation d'acétylméthyl carbinol).
IC : milieu citraté de Simmons.

Dans cette même famille, appartenant à la tribu des *Salmonelleæ* se classe *Bacillus fæcalis alcaligenes :*

Morphologie et type respiratoire :

C'est un bâtonnet mobile à Gram négatif, à granulations bipolaires mesurant de 1,5 à 2 μ de longueur et 0,6 μ de largeur. Il est anaérobie facultatif.

Caractères culturaux :

Il donne des colonies lenticulaires sans gaz en *gélose profonde* et des colonies blanches et grasses sur *gélose inclinée.* Il pousse abondamment en *bouillon glucosé* avec formation d'une collerette.

Caractères biochimiques :

Il ne fait fermenter aucun sucre : tous les bouillons sucrés sont alcalinisés (pH 7,8 à 8,2). Il pousse en milieu citraté; en bouillon peptoné il ne forme pas d'indol. Il ne réduit ni les nitrates en nitrites, ni les sulfites en sulfures; il ne possède pas d'uréase mais une catalase.

B a c i l l a c e a e : Bâtonnets à Gram positif.

Bacillus subtilis :

Morphologie et type respiratoire :

Bâtonnet mobile (3 à 4,4× 1 μ) isolé ou en courtes chaînettes, sporulé. Il est anaérobie facultatif.

Culture :

— *sur gélose :* colonies circulaires irrégulières, gris jaunâtre à surface finement granuleuse.

— *sur gélatine :* croissance discrète avec un entonnoir de liquéfaction; *le bouillon* est troublé avec léger dépôt et formation d'une pellicule à la surface.

Propriétés biochimiques :

Il acidifie sans gaz les bouillons glucosé, maltosé, saccharosé. Il ne donne pas d'indol en eau peptonée; il coagule le lait. Il réduit les nitrates en nitrites.

C o r y n e b a c t e r i a c e a e :

Corynebacterium :

Morphologie et type respiratoire :

Bacilles grêles prenant le Gram, présentant des granulations métachromatiques; non mobiles, non sporulés, anaérobies micro-aérophiles.

Caractères culturaux :

Les colonies sont arrondies en *gélose profonde,* sans formation de gaz; sur *gélose inclinée* les colonies sont très maigres après 48 heures. Il pousse en *bouillon glucosé* avec un léger dépôt. Il ne pousse dans nos milieux de culture initiaux qu'après addition d'extrait de levure.

Caractères biochimiques :

Il fermente le glucose, le maltose et le galactose. Il ne produit pas d'indol en milieu peptoné, ne coagule pas le lait, produit une uréase.

Lactobacteriaceae :

Tribu des Streptococceæ :

Streptococcus bovis : Ce germe a été isolé à partir de tous les acides aminés étudiés. Une fois isolé, il ne pousse qu'en présence de peptones ou d'extrait de levure.

Morphologie et type respiratoire :

Ce sont des petits cocci (1 μ) qui se présentent en courtes chaînettes ou isolés. Ils se colorent au Gram. Ils sont anaérobies facultatifs.

Caractères culturaux :

En gélose profonde, les colonies sont lenticulaires, elles deviennent énormes si le milieu renferme de l'extrait de levure (fig. 35 b).

Sur gélose inclinée : les colonies sont fines et translucides.

Sur gélose au sang : il est α-hémolytique.

Il forme un dépôt pulvérulent en *bouillon glucosé.*

Caractères biochimiques :

Il fermente l'amidon, l'arabinose, le galactose, le glucose, le lactose, le maltose, le saccharose, l'esculine. Il ne pousse pas en eau peptonée. Il coagule généralement le lait. Il produit de l'acétylméthylcarbinol. Il ne liquéfie pas la gélatine. Il ne réduit pas les nitrates en nitrites. Il ne possède ni uréase ni catalase.

Streptococcus fæcalis :

Morphologie et type respiratoire :

Il se présente sous forme de cocci isolés ou groupés par

deux ou en courtes chaînettes ou en amas. Il prend le Gram, est anaérobie facultatif.

Caractères culturaux :

En gélose profonde : les colonies sont lenticulaires sans formation de gaz (fig. 35 a) ;

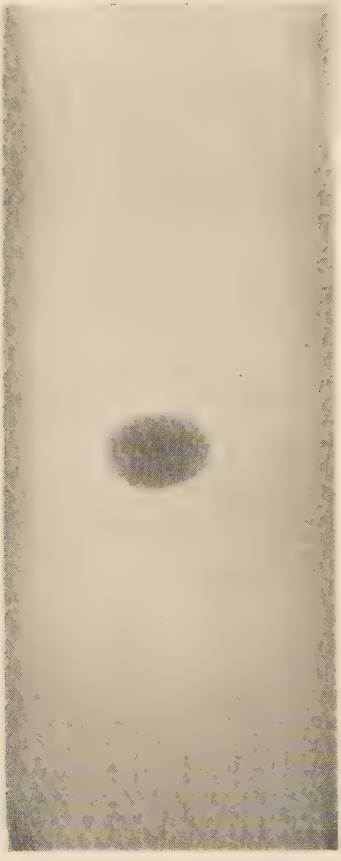
Fig. 35

Forme de quelques colonies isolées

a) Colonie lenticulaire (*Streptococcus faecalis*)

b) Colonie discoïde (*Streptococcus bovis*)

Fig. 35



c) Colonie en houppette
(*Lachnospira*)

Sur gélose inclinée : les colonies sont fines et bleutées.

Sur gélose au sang : il n'est pas hémolytique.

Il pousse entre 10 et 46°C.

Caractères biochimiques :

Il fermente l'arabinose, le galactose, le lactose, le lévulose, le maltose, la mannite, le saccharose et l'esculine. Il pousse en eau peptonée sans libération d'indol. Il coagule le lait; il ne liquéfie pas la gélatine.

Caractères différentiels :

Il pousse à 10°C. Il croît en bouillon hypersalé (ClNa à 6,5 %) ainsi que dans le lait après addition de 0,1 % de bleu de méthylène.

Nous avons également isolé un bon nombre de cocci, diplocoques, microcoques que nous n'avons pas cherché à étiqueter et qui présentent les caractères suivants :

Ils prennent tous la coloration de Gram et sont anaérobies facultatifs.

Caractères culturaux :

En gélose profonde : les colonies sont lenticulaires sans formation de gaz.

Sur gélose inclinée : les colonies sont petites et translucides.

Le bouillon glucosé : est toujours troublé avec dépôt plus ou moins abondant.

Caractères biochimiques :

Ils se différencient par la fermentation des glucides. Aucun n'attaque l'amidon. Ils fermentent tous le galactose, le glucose, le maltose. Certains fermentent l'arabinose, le lactose, le lévulose, la mannite, le saccharose, l'esculine. Ils poussent en eau peptonée sans libération d'indol. Ils coagulent tous le lait et certains le digèrent. Ils ne possèdent ni uréase, ni catalase.

Après culture des germes par la méthode d'enrichissement du milieu en présence d'un seul acide aminé, nous n'avons isolé que des anaérobies facultatifs. On pourrait se demander si le facteur limitant est l'acide aminé, ou le caractère plus ou moins strict de l'anaérobiose.

Nous avons alors essayé de cultiver les germes directement en gélose profonde, la gélose ne renfermant qu'un seul acide aminé comme source d'azote. Nous avons isolé les mêmes types que précédemment. Mais en ajoutant à notre milieu gélosé de l'extrait de levure ou des peptones, nous avons réussi à isoler des anaérobies stricts : ce sont des germes qui présentent les caractères de :

L a c h n o s p i r a : bâtonnets à Gram négatif légèrement incurvés. Anaérobie strict.

Caractères culturaux :

Les colonies sont ouatées en gélose profonde (fig. 35 c).

Caractères biochimiques :

Le germe fermente le glucose, le lactose, le mannitol : il produit de l'indol;
et de :

B a c t e r o i d e s r u m i n i c o l a : ce sont de fins bâtonnets à Gram négatif. Anaérobie strict.

Caractères culturaux :

Les colonies sont lenticulaires sans gaz.

Caractères biochimiques :

Il hydrolyse l'amidon, fermente le glucose, le lactose, le maltose. Il ne produit pas d'indol.

Discussion des résultats

Les bactéries décrites ont été isolées plusieurs fois à partir de 50 bovins d'abattoir et d'un mouton à fistule du rumen. Bien qu'ayant mis en évidence des souches appartenant à plusieurs types respiratoires (anaérobie facultatif, microaérophile, anaérobie strict) (fig. 36), *les principales espèces isolées sont des anaérobies facultatifs.* Les mêmes espèces ont été trouvées aussi bien dans le cas des bovins que des ovins.

En 1948, Elsden et Phillipson énoncent deux critères pour juger si un microorganisme a un rôle significatif dans le métabolisme du rumen :

1° L'organisme doit être capable d'effectuer une réaction déjà connue dans le rumen et être présent en nombre suffisant : le chiffre de 10^6 microorganismes par ml a été adopté comme limite inférieure;

2° Seuls les anaérobies stricts sont des microorganismes réellement fonctionnels dans le rumen.

Cette dernière affirmation n'est pas nécessairement vraie. Beaucoup d'espèces présentes dans le rumen proviennent de la plante-aliment. Gutteriez (1953) trouve les mêmes bactéries sur le foin et dans le rumen d'animaux nourris de ce foin. Ces bactéries passent donc de la vie aérobie à la vie anaérobie. D'autre part, Heald et coll. (1953) isolent 300 anaérobies facultatifs du rumen de mouton. Appleby (1955), Blackburn et Hobson (1960) ont mis en évidence des bactéries protéolytiques qui appartiennent, pour la plupart, au groupe des anaérobies facultatifs.

La culture initiale des germes par la méthode d'enrichissement du milieu a un effet très sélectif sur la microflore du rumen. Ce milieu est, en effet, très pauvre en azote et il

Fig. 36

Type respiratoire de quelques germes isolés en culture pure

a) anaérobies facultatifs (*E. coli*)

(*Streptococcus bovis*)

Fig. 36.

b) Microaerophile (*Corynebacterium*)

c) Anaérobie strict (*Bacteroides ruminicola*)

est certain que le facteur limitant est l'amino-acide choisi. En effet, nous n'avons réussi à isoler des anaérobies stricts, espèces plus exigeantes, qu'après ensemencement direct des germes en gélose profonde contenant soit des peptones, soit de l'extrait de levure, en plus de l'amino-acide.

Parmi les espèces isolées, la plupart ont été identifiées : elles appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae, des Bacillaceae, des Corynebacteriaceae, des Lactobacillaceae, d'autres sont des anaérobies stricts particuliers au rumen. Nous n'avons pas étiqueté les cocci et les coccobacilles dont les espèces sont extrêmement nombreuses dans le rumen, comme le montre un simple examen microscopique.

Parmi les coliformes, plusieurs souches d'*Escherichia coli* ont été identifiées, formes typiques et atypiques possédant toutes une tryptophanase très active. On trouve également des *Aerobacter* caractérisés par l'absence de tryptophanase. Ces espèces sont peu exigeantes et croissent bien sur tous les acides aminés cycliques. D'après Mc Kay et Oxford (1954) les Coliformes peuvent varier en nombre de 0 à 10^6 par gramme d'ingesta de rumen. Ainsi, si certaines bactéries ne sont pas toujours présentes, par contre, dans certaines conditions favorables, elles peuvent prédominer.

L'indol est un métabolite courant du tryptophane produit par *E. coli*, mais nous avons également obtenu une réaction indol-positive avec un bâtonnet à Gram négatif qui présente les caractères de *Lachnospira*. Or *Bacteroides ruminicola* (souche 7) de Bladen et coll. (1961), *Bacteroides succinogenes* de Bryant et coll. (1955), *Streptococcus bovis* à pigment jaune-orangé de Gieseche (1960), produisent également de l'indol. Par contre, nous n'avons isolé qu'une espèce à Gram négatif capable de produire de l'acide indol-acétique à partir du tryptophane (Thibault et Le Minor, 1957).

Streptococcus fæcalis décarboxyle la tyrosine et la phénylalanine et produit de l'ammoniac en eau peptonée.

Streptococcus bovis est une espèce très représentative du rumen (10^6 à 10^9 par gramme d'ingesta d'après Hungate, 1960). Comme source d'azote les composés simples ammoniacaux lui suffisent (Wolin et coll., 1959) alors que les acides aminés sont, en général, peu efficaces pour sa croissance (Prescott et coll., 1959). Peu de souches possèdent des désaminases, mais elles se révèlent toutes capables d'utiliser l'ammoniac produit par d'autres espèces. Voilà pourquoi sur bon nombre d'acides aminés qu'elles sont incapables de cataboliser nous les avons isolées, toujours en

présence d'autres espèces : c'est un exemple de symbiose. De toutes les espèces que nous avons isolées, une seule *Corynebactérie* s'est révélée uréolytique. Or Carroll (1961) qui donne des régimes à base d'urée à ses animaux, isole de nombreux *Streptococcus bovis* non uréolytiques et quelques Corynebactéries décomposant l'urée. De nombreux cocci et coccobacilles à Gram positif croissent bien sur tous nos milieux.

C'est seulement par culture directe en gélose profonde et après addition d'extrait de levure que nous avons mis en évidence des anaérobies stricts tels que *Lachnospira* et une espèce apparentée à *Bacteroides ruminicola*. Or, d'après les premiers résultats de Bladen et coll. (1961), *Lachnospira* ne produit pas d'ammoniac à partir de milieux riches ou pauvres en protéines, tandis que *Bacteroides ruminicola* est l'espèce productrice d'ammoniac la plus importante, c'est là peut-être encore un exemple d'association symbiotique.

Il est certain que cette partie bactériologique de notre travail n'est qu'ébauchée, et il faudrait étudier le catabolisme de chaque acide aminé en présence de chaque souche pure. On ne peut pas dire que toutes les espèces capables de pousser sur un seul acide aminé jouent un rôle dans la dégradation de ce composé; et vice-versa, toutes les espèces qui interviennent dans la dégradation de tel acide aminé ne sont pas capables de pousser sur cette unique source azotée, soit qu'un sel ammoniacal, ou un autre acide aminé ou un peptide ou la caséine leur soient indispensables. Il faut enfin citer l'existence des associations symbiotiques. Dohner et Cardon (1954) rapportent un cas intéressant de symbiose entre deux souches d'*E. coli* isolées du rumen : des cultures pures n'attaquent pas la lysine alors qu'ensemble elles dégradent cet acide aminé en ammoniac, acide butyrique et acide acétique.

Conclusion

Bien qu'aucun acide aminé ne soit indispensable pour l'ensemble de la microflore, nous n'avons isolé qu'un nombre limité de types, après culture des bactéries sur un milieu contenant un seul acide aminé comme source azotée; ce qui prouve que de tels milieux sont hautement sélectifs. Peu d'espèces sont capables de dégrader les acides aminés cycliques, c'est ce qui peut expliquer leur attaque lente par la flore mixte.

Sur 89 souches isolées fraîchement du rumen, Bryant

et Robinson (1962) montrent que 6 % ont besoin d'un hydrolysat de caséine, 56 % poussent bien avec de l'ammoniac (l'ammoniac étant essentiel pour 25 % des souches). On voit l'importance de l'ammoniac dans la croissance des bactéries du rumen et le peu d'importance de l'azote organique (acides aminés) dans la nutrition de ces organismes.

Il est certain que les amino-acides rapidement désaminés doivent entraîner une beaucoup moins grande sélection d'espèces.

Ainsi le milieu nutritif a une influence notable sur la composition de la microflore. Si l'alimentation des animaux varie, la flore digestive varie. Par le jeu de prédominance d'espèces, qui, à leur tour, entraînent une constellation d'autres espèces, l'animal peut s'adapter à une alimentation variée. Il faut rechercher celle dont l'animal tire le plus de profit. Mais ceci dépasse notre cadre pour atteindre celui de la zootechnie.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans ce travail, nous nous sommes penchée sur quelques aspects du rôle des bactéries dans la nutrition du Ruminant et nous avons apporté des données nouvelles concernant le métabolisme des acides organiques non volatils. En recherchant l'origine de ces acides, nous avons été amenée à étudier la dégradation des acides aminés cycliques qui n'avaient fait l'objet que de travaux rares et fragmentaires.

Les résultats qui nous paraissent les plus importants sont les suivants :

Acides organiques

1° Nous avons mis au point des techniques pour l'étude qualitative et quantitative des acides organiques non volatils dans la liqueur du rumen. La détermination a été effectuée par chromatographie sur papier et le dosage par une méthode électrométrique.

2° Grâce à ces techniques nous avons mis en évidence, de façon systématique, une quinzaine d'acides fixes dans la panse des bovins. Nous citerons ceux qui, à notre connaissance, n'avaient jamais encore été signalés dans le rumen; ce sont les acides adipique, p-amino-benzoïque, indol-acétique, indol-propionique, phénylacétique, phényl-propionique, pyrrolidone-carboxylique et quinique.

3° Nous avons montré que si ces acides ont en partie une origine alimentaire directe, la plante-aliment étant riche en acides organiques, ils proviennent surtout de l'activité métabolique des bactéries s'exerçant sur les glucides, lipides et protides de la ration.

La plupart de ces acides fixes sont dégradés en acides volatils, soit directement, soit par l'intermédiaire d'autres acides fixes. Nous avons recherché les produits de dégradation des acides citrique, tartrique et pyrrolidone-carboxylique, qui n'avaient fait l'objet d'aucune étude dans la panse : ils sont également transformés en acides volatils.

4° Au point de vue quantitatif, l'acidité fixe est toujours faible par rapport à l'acidité volatile, ce qui est le signe d'une intense activité bactérienne; elle ne représente que 3 à 6 % de l'acidité totale chez l'animal d'abattoir; elle croît

après le repas et peut s'élever de 10 à 20 % selon la ration, puis elle diminue tandis que l'acidité volatile augmente. Dans le feuillet, l'acidité fixe est presque inexistante par suite des phénomènes d'absorption et de métabolisation.

Les acides fixes présentent un intérêt physiologique réel puisqu'ils sont des précurseurs d'acides gras volatils et nous avons discuté, dans la première partie de ce travail, l'importance de ces acides dans la nutrition de l'animal.

Acides aminés cycliques

Les acides aminés cycliques sont des précurseurs d'acides organiques fixes ou volatils dans le rumen. Leur catabolisme est évidemment très différent selon la structure chimique du noyau qui les constitue.

1° Ainsi nous avons montré que la *L-phénylalanine* et la *L-tyrosine* sont dégradées selon un processus aérobie et que ces acides sont désaminés et décarboxylés par des L-amino-acide-oxydases avec formation d'acides *phénylacétique* et *p-hydroxyphénylacétique*. Or, on sait que le contenu de rumen est un milieu anaérobie strict. Mais la tension d'oxygène, bien que très faible, n'y est cependant pas inexistante et il est certain que de petites quantités d'oxygène doivent diffuser dans le rumen en même temps que le bol alimentaire à la suite des phénomènes de déglutition et de rumination. Des processus oxydatifs de cet ordre aideraient donc à maintenir constant le potentiel redox dans le rumen.

De plus, nous avons mis en évidence un nouveau processus de dégradation de la tyrosine : sa réduction en *acide phénylpropionique*. Bien que le mécanisme de déshydroxylation du noyau benzénique soit totalement inconnu, la formation de ce composé à partir de la tyrosine nous paraît hautement probable si on prend en considération les travaux tout récents de Scott et coll. (1963).

2° Nous avons montré l'existence d'une histidase et d'une urocanase dans le rumen : la *L-histidine* est convertie en *acides glutamique et formique*.

3° Les corps à noyau pyrrolidine subissent un catabolisme beaucoup plus profond que les composés aromatiques; le cycle est ouvert et nous avons constaté l'apparition dans les milieux d'incubation :

d'acide δ-amino-valérique à partir de la *proline* (nous avons montré que la proline pouvait être réduite par un mécanisme autre que la réaction de Stickland),

- *d'acide δ-amino-γ-hydroxy-valérique* à partir de l'hydroxyproline. Le produit du catabolisme de cet acide n'avait jamais été caractérisé,

— *d'acide γ-amino-butyrique* à partir de la 2-pyrrolidone.

4° Le *L-tryptophane* est dégradé en composés indoliques. Seuls l'indol et le scatol avaient été signalés comme catabolites de cet amino-acide par les bactéries du rumen. Nous avons, pour notre part, mis en évidence la formation de trois autres composés provenant de la dégradation de cet amino-acide et qui sont par ordre d'importance et de fréquence décroissantes : *l'acide indol-acétique, l'acide indol-propionique, l'acide hydroxy-5-indolacétique.*

Le dernier corps, tout comme la sérotonine et d'autres catabolites dérivés du tryptophane, possède une activité pharmacologique puissante. S'il est absorbé par la paroi du rumen, il n'est pas exclu que l'acide hydroxy-5-indol-acétique joue un rôle dans la physiologie de l'hôte.

Nous avons étudié *l'activité tryptophanasique* des poudres acétoniques des bactéries du rumen : elle est de 0,8 en moyenne et s'avère 5 à 10 fois plus élevée pour une poudre pure d'*E. coli* isolé du rumen.

Nous avons mis en évidence deux pH optimums d'action de l'enzyme : l'un de 7,5 et l'autre de 6,2 ; ce dernier n'avait jamais été signalé et on peut penser que ces deux pH correspondent à des espèces différentes de bactéries. Nous avons également étudié l'influence de quelques sucres sur la formation de l'enzyme, puisque celle du glucose était bien connue. Nous n'avons pas pu disposer d'un nombre suffisant d'oses pour établir une relation entre le nombre de carbones de l'ose et l'activité de l'enzyme. Cependant nous avons montré que les sucres réduits, sorbitol, mannitol, glycérol sont sans action ; alors que les sucres oxydés (acide gluconique), réduisent considérablement l'activité de l'enzyme.

5° Après avoir étudié le catabolisme des acides aminés cycliques il nous a paru logique de rechercher parmi la grande variété des microorganismes du rumen, quels étaient les agents effecteurs. Nous avons ainsi été amenée à rechercher l'influence de ces amino-acides introduits individuellement comme seule source d'azote sur la croissance des bactéries. Les acides aminés cycliques ne se montrent pas tous aptes à favoriser la croissance des bactéries, et nous avons pu établir une relation entre la multiplication bacté-

rienne et l'aptitude de l'acide aminé à fournir de l'ammoniac.

6° Avec un milieu ne comportant qu'un seul acide aminé comme source azotée, on crée une véritable sélection d'espèces. Ainsi par repiquages successifs des germes sur un tel milieu on favorise le développement d'une flore nouvelle qui est capable de bien utiliser cet acide aminé et de présenter une croissance maximale. Nous avons favorisé cette sélection pour rechercher les espèces susceptibles de jouer un rôle dans le catabolisme des acides aminés cycliques. Les principales espèces que nous avons isolées sont anaérobies facultatives. Elles appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, des *Bacillaceae*, des *Corynebacteriaceae*, des *Lactobacillaceae*, et ne font pas partie des types habituellement prédominants dans le rumen. Ceci explique sans doute l'attaque lente des acides aminés cycliques par les bactéries de la panse, peu de microorganismes étant capables de les dégrader.

Les *résultats acquis*, brièvement rappelés, permettent d'apporter une contribution à l'étude de l'activité métabolique de la flore mixte du rumen, activité qui peut être envisagée sous le double aspect biochimique et physiologique.

Ce travail nous a, en effet, permis de mettre à jour des métabolismes nouveaux tels la dégradation de la tyrosine en acide phényl-propionique et peut-être la transformation de la tyrosine en phénylalanine. Ces recherches, qui s'adressent à des faits d'un ordre beaucoup plus général, nous ont permis de dépasser le cadre du rumen et du Ruminant.

Mais bien que les processus métaboliques qui ont lieu dans le rumen présentent en eux-mêmes un intérêt considérable, c'est en relation avec le métabolisme de l'animal lui-même qu'il faut les considérer et nous devons maintenant nous demander dans quelle mesure l'étude du contenu de la panse peut nous aider à mieux comprendre la physiologie des Ruminants. Ce sont les microorganismes du rumen qui, en définitive, assurent la nutrition de l'hôte-porteur.

Nous avons vu que les bactéries sont très importantes par leur nombre et par leur poids. Or la masse sèche des microorganismes du rumen est constituée par des bactéries et des protozoaires en quantités voisines : au total entre 1,5 et 3 kg selon le régime alimentaire (ces chiffres donnés par Fauconneau sont calculés pour un rumen de 150 litres de capacité).

La masse active de protoplasme de ces microorganismes représente un poids supérieur à celui du foie de l'animal. De plus, le rapport $\frac{\text{N purique}}{\text{N protéique}} \times 100$ n'est que de 4,5 dans le foie (Terroine et Ritter, 1927) il est environ deux fois plus élevé chez les microorganismes : il se tient autour de 7 pour le bacille tuberculeux et le bacille de la Fléole, oscille entre 9 et 11 pour *Saccharomyces nigra* et dépasse 11 dans la levure (Terroine et Szucs, 1930). Au total, et bien qu'il soit difficile de l'apprécier, l'ensemble des microorganismes de la panse représente vis-à-vis du Ruminant une masse cellulaire énorme d'une intense activité métabolique, ce qui confère un caractère très particulier aux phénomènes de la digestion de l'hôte-porteur et qui le différencie nettement des Monogastriques.

Tous les Herbivores ont, en effet, une partie de leur tractus digestif qui s'est particulièrement développée et dans laquelle les fibres végétales subissent une fermentation qui est nécessaire à leur assimilation. Chez le Ruminant c'est le rumen qui assure cette fonction et à un moindre degré le cæcum et le côlon. Chez les autres Herbivores, tels que le cheval et le lapin, c'est dans le cæcum, très développé, que sont dégradés les aliments qui ont, jusqu'alors, échappé à la digestion et de l'estomac et de l'intestin grêle. On saisit alors toute la différence des processus digestifs chez le Ruminant et chez le non-Ruminant : la population microbienne du rumen joue un rôle capital parce que le *rumen est la première cavité digestive* tandis que la microflore du cæcum, poche qui se trouve en fin de trajet digestif, n'a qu'un rôle secondaire.

Les microorganismes du rumen assurent à l'hôte ses besoins énergétiques et plastiques.

En ce qui concerne *le métabolisme énergétique,* le Ruminant n'absorbe que de très petites quantités de sucres au niveau du tube digestif, par contre de grandes quantités d'acides volatils sont décelées dans les veines qui drainent le rumen. On sait, en effet, que le sang des Ruminants adultes présente une glycémie environ deux fois plus faible que celle des autres Mammifères et une teneur environ six fois plus élevée en acides gras volatils. Ces différences sont surtout accusées quelques heures après la consommation de la ration, car alors chez les Ruminants :

— la glycémie n'augmente pas de façon appréciable (Schambye, 1951),

— la teneur en acides gras volatils du sang artériel augmente proportionnellement à l'intensité de la fermentation dans le rumen chez le mouton (Schambye et Phillipson, 1949) et chez la vache (Mc Clymont, 1951).

Ces acides volatils vont servir d'aliment énergétique au Ruminant alors que chez le non-Ruminant l'énergie provient des seuls composés glucidiques en C_6. Phillipson et Cuthbertson (1956), ont calculé qu'au moins 600 à 1200 calories sont absorbées sous forme d'acides gras volatils par le rumen de mouton par 24 heures, dix fois plus pour le bétail (Carroll et Hungate, 1954). Le turnover énergétique total du mouton et du bœuf adultes à jeun est respectivement de 1 100 et 6 500 calories par jour, ce qui indique que les acides gras volatils apportent une contribution majeure aux besoins énergétiques; il est, en effet, reconnu que ces acides sont utilisés par les tissus de l'animal : une partie est oxydée, l'autre entre dans la synthèse des trois grandes catégories de constituants : lipides, glucides et protides. C'est surtout la technique des isotopes qui a mis en évidence les modalités de cette utilisation (Annison et Lindsay, 1961; Essig, 1960).

Comment les microorganismes assurent-ils *les besoins plastiques* de l'hôte-porteur ?

Besoins en azote. — Le type habituel du métabolisme de l'azote chez les Monogastriques est modifié chez le Ruminant du fait de la synthèse des protéines microbiennes dans le rumen. A ce sujet, nous voudrions ajouter un mot sur le rôle des protozoaires, qui est nettement moins bien connu que celui des bactéries : ils ingèrent ces dernières et transforment ainsi les protéines bactériennes en protéines de protozoaires qui ont un meilleur coefficient de digestibilité (91 contre 74 chez le rat d'après Mc Naught et coll., 1954) du fait de leur richesse plus grande en acides aminés essentiels et en particulier en lysine (Weller, 1957). Et bien que les protozoaires ne jouent aucun rôle vital pour l'hôte puisqu'ils n'utilisent ni la cellulose, ni les substances azotées non protéiques, ils réalisent néanmoins une véritable symbiose avec lui. Ce sont donc les microorganismes qui fournissent au Ruminant ses acides aminés essentiels.

Composition des graisses. — La composition des graisses corporelles et des lipides du lait montre la profonde influence des fermentations qui ont lieu dans le rumen sur les aliments ingérés. Nous avons développé quelques-uns de ces faits dans le chapitre consacré aux acides organiques.

Nous ajouterons ici quelques remarques supplémentaires qui opposent encore une fois la différence de fonctionnement du Ruminant et du non-Ruminant. On sait depuis plusieurs années que le taux de matières grasses du lait est lié à l'alimentation et plus directement à la production d'acides volatils. Les graisses du lait des Ruminants sont relativement riches en acides gras inférieurs ce qui les différencie nettement de celles du lait des autres Mammifères; leur indice de Reichert (qui traduit la teneur en acides gras volatils solubles dans l'eau : acide butyrique et acide caproïque) est beaucoup plus élevé (23 à 36 chez la vache contre 7 chez la jument et 1,4 à 3,4 chez la femme).

Les acides gras non saturés du régime sont partiellement ou complètement hydrogénés dans le rumen (Shorland et coll., 1955), fait qui explique la relative constance de la composition des graisses du Ruminant. Reiser (1951) montre que les graisses de réserve du mouton et du bétail contiennent très peu d'acide linolénique même si la ration en apporte des quantités considérables, tandis que le non-Ruminant (cheval), soumis au même régime en dépose des quantités appréciables.

D'autre part, la découverte par Hansen et coll. (1955) de petites quantités d'acides gras à nombre de carbones impair et à chaîne ramifiée dans le lait et dans les graisses du Ruminant a posé la question de leur origine. Les recherches récentes de Bhalerao et coll. (1961) sur l'absence d'acides en C_{13}, C_{15} et C_{17} (n- et iso-), dans les lipides de rats élevés avec de l'huile de blé et du lard, et leur présence si on les nourrit avec du beurre, suggèrent que chez le rat ces acides ont une origine alimentaire.

De leur côté, Keeney et coll. (1962) dénoncent l'origine bactérienne plutôt qu'animale de ces acides dans les lipides du lait et les graisses de réserve du Ruminant. En effet, ces auteurs ont révélé le taux élevé de ces acides dans la fraction phospholipidique des bactéries du rumen (20,3 % d'acides gras à chaîne ramifiée en C_{15}). Ces acides sont également décelables dans les lipides sériques; ils peuvent ainsi être captés par la glande mammaire pour être incorporés dans les lipides du lait. Cette série d'exemples montre la possibilité du passage dans les tissus animaux de certains métabolites particuliers aux bactéries.

Synthèse des vitamines. — Enfin les microorganismes du rumen assurent à l'animal ses besoins en vitamines et particulièrement en vitamines du groupe B : B_1, B_2, acide nicotinique, acide folique, acide pantothénique, biotine, B_6, B_{12} et en vitamine K.

Ainsi la physiologie du rumen intéresse :

— *le biologiste,* car le Ruminant représente la forme la plus différenciée de l'Herbivore puisqu'il est capable d'extraire de la fibre végétale beaucoup plus de nutriments qu'aucune autre espèce;

— *le bactériologiste,* qui, vu la densité des microorganismes, peut isoler de nouvelles espèces et mettre à jour des associations symbiotiques jamais rencontrées ailleurs;

— *le biochimiste,* qui, vu la richesse du milieu, a la possibilité de découvrir des processus métaboliques nouveaux. C'est ce que nous avons, à plusieurs reprises, tenté de réaliser dans ce travail. Mais il est certain que nos recherches devraient être complétées par des méthodes isotopiques dont l'emploi dans le métabolisme intermédiaire s'est toujours révélé fructueux;

— *le physiologiste et le nutritioniste,* car la principale activité des microorganismes est la conversion de la cellulose en acides gras volatils dont l'utilisation est un problème majeur dans la physiologie du Ruminant, étant donné les quantités impressionnantes produites quotidiennement. Tous les physiologistes ont été frappés par cette remarquable symbiose entre microorganismes et hôte-porteur. Des associations symbiotiques existent de plus entre bactéries et entre bactéries et protozoaires.

D'autre part, la composition du régime influence la microflore et nous en avons donné un exemple dans nos expériences où nous faisions varier les acides aminés du régime. Ainsi par le jeu des prédominances d'espèces qui à leur tour peuvent entraîner une constellation d'autres espèces, l'animal peut s'adapter à une alimentation variée. La microflore assure donc un rôle de régulation dans le métabolisme de l'animal, grâce à la sélection des souches qui s'opère en fonction des constituants de la ration.

En définitive, le rumen joue un double rôle régulateur. D'une part, certaines modifications alimentaires entraînent une adaptation de la flore du rumen et permettent à l'animal de maintenir son équilibre métabolique. D'autre part, ces variations de la population microbienne agissent à leur tour sur la nature des nutriments mis à la disposition du Ruminant et par là-même influencent considérablement la croissance et les productions des animaux. Ces faits présentent un intérêt à la fois physiologique et économique et justifient amplement l'importance des études biochimiques portant sur les microorganismes du rumen.

Vu et permis d'imprimer.

Toulouse, le 25 octobre 1963.

Vu, *le Doyen :*

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université :

Paul Dottin.

OUVRAGES CONSULTES

Annison E.F. and Lewis D. — Metabolism in the rumen. Methuen's monographs on Biochemical subjects. John Wiley and sons inc. New York, 1959.

Barnett A.J.G. and Reid R.L. — Reactions in the rumen. Edward Arnold publishers L.T.D., London, 1961.

Colowick S.P. and Kaplan N.O. — Methods in Enzymology. Vol. I and II. Academic Press inc. Publishers New York, 1955.

Fruton J.S. and Simmonds S. — General Biochemistry. Second edition. John Wiley and sons, inc. New York, 1951.

Fry B.A. — The nitrogen metabolism of microorganisms. Methuen's monographs on Biochemical subjects. John Wiley and sons inc. New York, 1955.

Gunsalus I.C. and Stanier R.Y. — The Bacteria. Vol. II and III, Academic Press, New York and London, 1960.

Jacquot R., Le Bars H. et Simonnet H. — Données générales sur la nutrition et l'alimentation. Nouvelle encyclopédie agricole. Vol. I et II. J.B. Baillère et Fils, éditeurs, Paris, 1958.

Lederer E. — Chromatographie en chimie organique et biologique, vol. I et II. Masson et Cie, éditeurs, Paris, 1959.

Meister A. — Biochemistry of the amino-acids. Academic Press inc. Publishers New York, 1957.

Terroine E.F. — La synthèse protéique. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1952.

Werkman C.H. and Wilson P.W. — Bacterial Physiology. Academic Press inc. Publishers New York, 1951.

BIBLIOGRAPHIE

1. Allison M.J., Bryant M.P. and Doetsch R.N. (1958). — Volatile fatty acid growth factor for cellulolytic cocci of bovine rumen. *Science, 128,* 474-475.
2. Annison E.F. (1954). — Some observations on volatile fatty acids in the sheep's rumen. *Biochem. J., 57,* 400-405.
3. Annison E.F. (1956). — Nitrogen metabolism in the sheep. Protein digestion in the rumen. *Biochem. J., 64,* 705-714.
4. Annison E.F. and Lindsay D.B. (1961). — Acetate utilization in sheep. *Biochem. J., 78,* 777-785.
5. Appleby J.C. (1955). — The isolation and classification of proteolytic bacteria from the rumen of the sheep. *J. Gen. Microbiol., 12,* 526-533.
6. Armstrong D.G. and Blaxter K.L. (1957). — The heat increment of steam volatile fatty acids in fasting sheep. *Brit. J. Nutr., 11,* 247-271.
7. Armstrong D.G. and Blaxter K.L. (1957). — The utilization of acetic, propionic and butyric acids by fattening sheep. *Brit. J. Nutr., 11,* 413-425.
8. Armstrong D.G., Blaxter K.L. and Graham N. Mc C. (1957). — The heat increments of mixtures of steam-volatile fatty acids in fasting sheep. *Brit. J. Nutr., 11,* 392-408.
9. Armstrong D.G., Blaxter K.L. and Graham N. Mc C. (1958). — The heat increment of acetic acid partially neutralized with sodium-hydroxide, in fasting sheep. *Proc. Nutr. Soc., 17,* XXXII.
10. Armstrong D.G., Blaxter K.L., Graham N. Mc C. and Wainmann F.W. (1958). — The utilization of the energy of two mixtures of steam-volatile fatty acids by fattening sheep. *Brit. J. Nutr., 12,* 177-188.
11. Balch C.C. (1958). — Observations on the act of eating in cattle. *Brit. J. Nutr., 12,* 330-345.
12. Baldwin R.L. and Emery R.J. (1960). — The oxidation-reduction potential of rumen contents. *J. Dairy. Sci., 45,* 506-511.
13. Barcroft J., Mc Anally R.A. and Phillipson A.T. (1944). — Absorption of volatile acids from the alimentary tract of the sheep and other animals. *J. Exptl. Biol., 20,* 120-129.
14. Bastié A.M. (1957). — Contribution à l'étude des acides organiques de la panse des Ruminants. *Arch. Sci. Physiol., 11,* 87-100.
15. Beauville M., Lacoste A.M. et Raynaud P. (1961). — Valeur individuelle des principaux acides aminés dans les cultures de bactéries du rumen. *Arch. Sci. Physiol., 15,* 363-375.
16. Begarie B., Blaizot J. et Raynaud P. (1961). — L'utilisation du toluène dans l'étude du métabolisme protéique des bactéries du rumen. *C.R. Soc. Biol. Fr., 155,* 657-662.

17. Bhalerao V.R., Endres J. and Kummerow F.A. (1961). — Fatty acid composition of lipids extracted from rats fed milk fat, corn oil and lard. *J. Dairy. Sci., 44,* 1283-1292.
18. Blackburn T.H. and Hobson P.N. (1960). — Isolation of proteolytic bacteria from the sheep rumen. *J. Gen. Microbiol., 22,* 282-289.
19. Bladen H.A., Bryant M.P. and Doetsch R.N. (1961). — A study of bacterial species from the rumen which produces ammonia from protein hydrolysate. *Appl. Microbiol., 9,* 175-180.
20. Blaizot J. et Raynaud P. (1957). — Présence d'acides aminés libres dans le rumen des Bovins. *C.R. Ac. Sci., 244,* 802-804.
21. Brasch W. (1909). — Uber den baktereillen Abbau primarer Eiweiszspaltproduckte. *Biochem. Zeitschr., 18,* 380.
22. Britten R.J., Roberts R.B. and French E.F. (1955). — *Proc. Nat. acad. Sci. Wash., 41,* 863, *in* Mandelstam.
23. Broberg G. (1957). — Measurements of the redox potential in rumen contents. I. *In vitro* measurements on healthy animals. *Nord. Vet. Med., 2,* 918-930.
24. Broberg G. (1958). — Measurements of the redox potential in rumen contents. IV. *In vivo* measurements. *Nord. Vet. Med., 10,* 263-268.
25. Brunaud M. et Raynaud P. (1956). — Fistulisation permanente du rumen du Mouton par la mise en place, en une seule opération, d'une canule en chlorure de polyvinyle. *Bull. Acad. Vét. Fr., 29,* 385-391.
26. Bryant M.P. (1956). — The characteristics of strains of *Selenomonas* isolated from bovine rumen contents. *J. Bacteriol., 72,* 162-167.
27. Bryant M.P. (1959). — Bacterial species of the rumen. *Bacteriol. Rev., 23,* 125-153.
28. Bryant M.P. and Doetsch R.N. (1955). — Factors necessary for the growth of *Bacteroides succinogenes* in the volatile acid fraction of rumen fluid. *J. Dairy Sci., 38,* 340-349.
29. Bryant M.P. and Robinson I.M. (1962). — Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. *J. Bacteriol., 84,* 605-614.
30. Bryant M.P., Small N., Bouma C. and Chu H. (1958). — *Bacteroides ruminicola* n. sp. *and Succinomonas amylolytica* the new genus and species. *J. Bacteriol., 76,* 15-23.
31. Carles J. et Alquier-Bouffard A. (1963). — Le dosage de l'acidité organique des tissus végétaux. *Bull. Soc. Chim. Biol., 45,* 157-163.
32. Carles J., Schneider A. et Lacoste A.M. (1958). — Contribution à l'étude chromatographique des principaux acides organiques. *Bull. Soc. Chim. Biol., 40,* 221-232.

33. Carroll E.J. (1961). — Urea utilizing organism from the rumen. *Dissert. Absts., 21,* 2432-2433.
34. Carroll E.J. and Hungate R.E. (1954). — The magnitude of the microbial fermentation in the bovine rumen. *Appl. Microbiol., 2,* 205-214.
35. Chance C.M., Smith C.K., Huffman C.F. and Duncan C.W. (1953). — Antibiotics in rumen digestion and synthesis. III. The effect of aureomycin on rumen microorganisms, with special reference to Streptococci and Coliform groups. *J. Dairy Sci., 36,* 743-751.
36. Claren (1942). — *Hoppe-Seyler Z., 276,* 97, *in* Jarrige.
37. Clark R. and Malan J.R. (1956). — Alterations in the blood sugar and ketone levels caused by dosing acetate, propionate and butyrate into the rumen of the sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res., 27,* 101-109.
38. Cohen G.N. (1949). — Nature et mode de formation des acides volatils trouvés dans les cultures de bactéries anaérobies strictes. *Ann. Inst. Pasteur, 77,* 471-511.
39. Cohen G.N. and Monod J. (1957). — Bacterial permeases. *Bacteriol. Rev., 21,* 169-194.
40. Cohen G.N., Nisman B. et Cohen-Bazire G. (1948). — Sort des amino-acides dégradés par *Cl. saccharobutyricum* et *Cl. sporogenes. Bull. Soc. Chim. Biol., 30,* 109.
41. Colin G. (1871). — Traité de Physiologie comparée des animaux. Baillère J.B. et fils éd., Paris.
42. Conway (1950). — Microdiffusion Analysis and volumetric error. London, Grosby Lockwood and Son Ltd.
43. Dain J.A., Neal A.L. and Dougherty R.W. (1955). — The occurence of histamine and tyramine in rumen ingesta of experimentally over-fed sheep. *J. Anim. Sci., 14,* 930-935.
44. Dalgliesh C.E. (1955). — Metabolism of aromatic amino-acids. *Adv. in Protein Chem., 10,* 33-150.
45. Davis R.F. (1955). — Intermediates in amino-acid biosynthesis. *Adv. in Enzymol., 16,* 247-312.
46. Davis R.F., Woodhouse N.S., Keeney M. and Beck G.M. (1957). — The effect of various levels of dietary protein upon the volatile fatty acids in the rumen of the dairy cow. *J. Dairy Sci., 40,* 75-80.
47. Deffner M. and Frank W. (1939). — *Ann., 541,* 85, *in* Gunsalus and Stanier.
48. Dehority B.A., Bentley O.G., Johnson R.R. and Moxon A.L. (1957). — Isolation and identification of compounds from autolysed yeast, alfalfa meal and casein hydrolysate with cellulolytic factor activity for rumen microorganisms *in vitro. J. Anim. Sci., 16,* 502-514.
49. Dehority B.A., Johnson R.R., Bentley O.G. and Moxon A.L. (1958). — Studies on the metabolism of valine, proline, leucine and isoleucine by rumen microorganisms *in vitro. Arch. Biochem. Biophys., 78,* 15-27.

50. Doetsch R.N., Shaw J.C., Mc Neill J.J. and Jurtshuk P. Jr. (1955). — Observations on the use of mixed suspensions of bovine rumen bacteria as a technique of the rumen microbiologist. *Maryland Agr. Exptl. sta., Misc. Publ., 238,* 1-2.
51. Dohner P.N. and Cardon B.P. (1954). — Anaerobic fermentation of lysine. *J. Bacteriol., 67,* 608-611.
52. Dougherty R.W. and Cello R.M. (1949). — Study of toxic factors in the rumen ingesta of cows and sheep. *Cornell vet., 39,* 403-409.
53. Dukes H.H. (1947). — « The physiology of domestic animals (Camstock ed.) », 6e édition, *in* Jarrige.
54. Durand G. — Communication personnelle.
55. Edlbacher S. and Kraus I. (1930). — Zur Kenntnis des intermediaren Stoffwechsels des Histidins. *Zeitschr. Physiol. Chem., 191,* 225.
56. Ellfolk N. and Synge R.L.M. (1955). — Detection of pyrrolidone-carboxylic acid. *Biochem. J., 59,* 523-526.
57. Elsden S.R. (1945). — The fermentation of carbohydrates in the rumen of the sheep. *J. Exptl. Biol., 22,* 51-62.
58. Elsden S.R. (1946). — The application of the silica gel partition chromatography to the estimation of volatile fatty acids. *Biochem. J., 40,* 252-256.
59. Elsden S.R. (1952). — *Proc. Royal. Soc.,* B., *139,* 193, *in* Barnett and Reid.
60. Elsden S.R., Gilchrist F.M.C., Lewis D. and Volcani B.E. (1951). — The formation of fatty acids by a gram-negative coccus. *Biochem. J., 49,* IX ix.
61. Elsden S.R., Hitchcock M.W.S., Marshall R.A. and Phillipson A.T. (1946). — Volatile acids in the digesta of Ruminants and other animals. *J. Exptl. Biol., 22,* 191-202.
62. Elsden S.R. and Phillipson A.T. (1948). — Ruminant digestion. *Ann. Rev. Biochem., 17,* 705-723.
63. El-Shazly K. (1952). — Degradation of protein in the rumen of the sheep. I. Some volatile fatty acids including branched chain isomers found *in vivo*. II. The action of rumen organisms on amino acids. *Biochem. J., 51,* 640-652.
64. Essig H.W. (1960). — Energy utilization and metabolism in the Ruminant. *Dissert. Absts., 20,* 2993.
65. Evans W.C., Handley W.R.C. and Happold F.C. (1941). — The tryptophanase indole reaction. 4. Some observations on the production of tryptophanase by *Esch. coli* in particular the effect of the presence of glucose and amino acids on the formation of tryptophanase. *Biochem. J., 35,* 207-212.
66. Fauconneau M. (1961). — Les bactéries et les protozoaires libres du rumen. Variations avec le régime alimentaire et le repas. *Ann. Nutr. Alim., 15,* 291-299.

67. Fewster M.E. and Hall A. (1951). — Application of buffered solvent systems to the detection of aromatic acids by paper partition chromatography. *Nature., 168,* 78.
68. Folley S.J. and French T.H. (1949). — Effect of glucose on the utilization of acetate by lactating mammary gland slices. *Biochem. J., 44,* XLV.
69. Gale E.F. (1941). — Production of amines by bacteria. 4. The decarboxylation of amino-acids by organisms of the groups *Clostridium* and *Proteus. Biochem. J., 35,* 66-79.
70. Gale E.F. (1947). — The assimilation of amino-acids by bacteria. I. The passage of certain amino-acids across the cell wall and their concentration in the internal environment of *Streptococcus fæcalis. J. Gen. Microbiol., 1,* 53-73.
71. Gieseche D. (1960). — Untersuchungen am *Streptococcus bovis* und einer gelb wachsenden Variante aus dem Rinderpansen. *Zhl. Bakteriol. Parasitenkde Infekt. Kronkh Hyg. I. Dtsch., 179,* 448-455.
72. Graham W.R., Houchin O.B., Peterson V.E. and Turner C.W. (1938). — The efficiency of the mammary gland in the production of milk. *Amer. J. Physiol., 122,* 150-153.
73. Gray F.V., Pilgrim A.F. and Weller R.A. (1951). — Fermentation in the rumen of the sheep. I. The production of volatile fatty acids and methane during the fermentation of wheaten hay and lucerne hay *in vitro* by microorganisms from the rumen. *J. Exptl. Biol., 28,* 74-82.
74. Guillaume J., Beerens H. et Osteux R. (1956). — La chromatographie sur papier des acides aliphatiques volatils de C_1 à C_6. Son application à la détermination des bactéries anaérobies. *Ann. Inst. Pasteur Lille, 8,* 13-52.
75. Gutierrez J. (1953). — Numbers and characteristics of lactate utilizing organisms in the rumen of cattle. *J. Bacteriol., 66,* 123-128.
76. Haberlandt G. (1918). — *Beitr. allg. Botanik., 1,* 501, *in* Barnett and Reid.
77. Halse K. and Velle W. (1956). — The relative rates of formation of acetic, propionic and butyric acids in the rumen of sheep. *Acta Physiol. Scand., 37,* 380-390.
78. Hansen R.P., Shorland F.B. and Cooke N.J. (1955). — The branched-chain fatty acids of ox fat. 3. The isolation of 14-methylpentadecanoic acid (isopalmitic acid) from ox perinephric fat. *Biochem. J., 61,* 547-549.
79. Happold F.C. and Hoyle L. (1935). — The Coli tryptophane indole reaction. I. Enzyme preparations and their action on tryptophan and some indole derivatives. *Biochem. J., 29,* 1918-1925.
80. Happold F.C. and Hoyle L. (1936). — The Coli tryptophane indole reaction. II. The non-production of tryptophanase in media containing glucose. *British J. Exptl. Pathol., 17,* 136-143.

81. Hayaishi O., Tabor H. and Hayaishi T. (1957). — N-formimino-L-aspartic acid as an intermediate in the enzymic conversion of imidazole-acetic acid to formylaspartic acid. *J. Biol. Chem.*, *227*, 161-180.

82. Heald P.J. (1952). — The fermentations of pentoses and uronic acids by bacteria from the rumen contents of sheep. *Biochem. J.*, *50*, 503-508.

83. Heald P.J., Krogh N., Mann S.O., Appleby J.C., Masson F.M. and Oxford A.F. (1953). — A method for direct viable counts of the facultatively anaerobic microflora in the rumen of a sheep maintained on a hay diet. *J. Gen. Microbiol.*, *9*, 207-215.

84. Henricksen S.D. (1950). — A comparaison of the phenylpyruvic reaction and the urease test in the differentiation of *Proteus* from other enteric organisms. *J. Bacteriol.*, *60*, 225-231.

85. Hershberger T.V., Bentley D.G., Cline S.H. and Tiznik W.J. (1956). — Formation of short chain fatty acids from cellulose, starch and metabolic intermediates by ovine and bovine rumen microorganisms. *J. Agric. Food. Chem.*, *4*, 952-956.

86. Holter J.B., Lakshmanan S. and Shaw J.C. (1959). — Determination of volatile fatty acids in bovine blood by isotope dilution. *J. Dairy Sci.*, *42*, 358-362.

87. Hoogerheide J. and Kocholaty W. (1938). — Metabolism of the strict anaerobes (*genus Clostridium*). II. Reduction of aminoacids with gaseous hydrogen by suspensions of *Cl. sporogenes*. *Biochem. J.*, *32*, 949-957.

88. Hopkins F.G. and Cole S.W. (1903). — *J. Physiol.* (London), *29*, 451, *in* Meister.

89. Hueter F.G., Gibbons R.J., Shaw J.C. and Doetsch R.N. (1958). — Comparison of *in vivo* and *in vitro* techniques in ruminology studies. *J. Dairy Sci.*, *41*, 651-661.

90. Hungate R.E. (1950). — The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev.*, *14*, 1-49.

91. Hungate R.E. (1960). — Symposium : selected topics in microbial ecology. I. Microbial ecology of the rumen. *Bacteriol. Rev.*, *24*, 353-364.

92. Hungate R.E., Mah R.A. and Simesen M. (1961). — Rates of production of individual volatile fatty acids in the rumen of lactating cows. *Appl. Microbiol.*, *9*, 554-561.

93. James A.T. and Martin A.J.P. (1952). — Gas liquid partition chromatography : the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic to dodecanoic acid. *Biochem. J.*, *50*, 679-690.

94. James A.T. and Martin A.J.P. (1956). — Gas liquid chromatography : the separation and identification of the methylesters of saturated and insaturated acids from formic acid to n-octadecanoic acid. *Biochem. J.*, *63*, 144-152.

95. Janke A. (1930). — Der Aminosäureabbau durch Mikroben. *Arkh. Mikrobiol., 1,* 304.
96. Jarrige R. (1953). — L'utilisation des glucides alimentaires par les Ruminants. *Ann. Nutr. Alim., 7,* 245-406.
97. Johns A.T. (1951). — The mechanism of propionic acid formation by *Veillonella gazogenes. J. Gen. Microbiol., 5,* 326-336.
98. Johnson R.B., Bentley O.G., Hibbs J.W. and Conrad H.R. (1956). — Ruminant nutrition. *In vivo* and *in vitro* nutritional requirements of rumen microorganisms. *J. agric. Food Chem., 4,* 627-631.
99. Keeney M., Katz I. and Allison M.J. (1962). — On the probable origin of some milk fat acids in rumen microbial lipids. *J. American Oil Chemists'Soc., 39,* 198-201.
100. Kleiber M., Black A.L., Brown M.A., Luick J., Baxter C.F. and Tolbert B.M. (1954). — Butyrate as a precursor of milk constituents in the intact dairy cow. *J. Biol. Chem., 210,* 239-247.
101. Kleiber M., Black A.L., Brown M.A. and Tolbert B.M. (1953). — Propionate as a precursor of milk constituents in the intact dairy cow. *J. Biol. Chem., 203,* 339-346.
102. Kleiber M., Cole and Mead (1943). — *J. Dairy Sci., 26,* 929 *in* Kleiber and coll., 1952.
103. Kleiber M., Smith A.H., Black A.L., Brown M.A. and Tolbert B.M. (1952). — Acetate as a precursor of milk constituents in the intact dairy cow. *J. Biol. Chem., 197,* 371-379.
104. Koukol J. and Cohn E.E. (1961). — The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine desaminase of *Hordeum vulgare. J. Biol. Chem., 236,* 2692-2698.
105. Lacoste A.M., Blaizot J. et Raynaud P. (1958). — Catabolisme de la phényl-alanine par les bactéries de la panse des Ruminants. *C.R. Ac. Sci., 246,* 1280-1281.
106. Ladd J.N. and Walker D.J. (1959). — The fermentation of lactate and acrylate by the rumen microorganisms L.C. *Biochem. J., 71,* 364-373.
107. Larsen P. (1951). — *Ann. Rev. Plant Physiol., 2,* 169, *in* Meister.
108. Laturaze J. (1959). — Etude chromatographique des acides organiques fixes des liquides biologiques. *Thèse.* Fac. Médecine et Pharmacie, Lille.
109. Le Bars H., Nitescu R. et Simonnet H. (1953). — Recherches sur la motricité du rumen chez les petits ruminants I. Motricité normale. II. Relation entre la motricité et la glycémie. *Bull. Acad. Vét. France, 26,* 287-350 et 351-360.
110. Lewis D. (1955). — Amino-acid metabolism in the rumen of the sheep. *Brit. J. Nutr., 9,* 215-230.
111. Lewis D. and Elsden S.R. (1955). — The fermentation of L-threonine, L-serine, L-cysteine and acrylic acid by a gram-negative coccus. *Biochem. J., 60,* 683-692.

112. Lewis T.R. (1961). — Amino-acid metabolism by rumen microorganisms. *Thèse,* Michigan State Univ., Ph.D. Agriculture, animal culture.
113. Lindan O. and Work E. (1951). — The amino-acid composition of two yeasts used to produce massive dietetic liver necrosis in rats. *Biochem. J., 48,* 337-344.
114. Linskens H.F. (1955). — Papier Chromatographie in der Botanik. Springer Verlag. *in* Laturaze.
115. Loosli J.K., Williams H.H., Thomas W.E., Ferris F.H. and Maynard L.A. (1949). — Synthesis of amino-acids in the rumen. *Science, 110,* 144-145.
116. Mc Anally R.A. and Phillipson A.T. (1942). — Absorption of volatile acids from the rumen of the sheep. *J. Physiol., 101,* 13P-14P.
117. Mc Anally R.A. and Phillipson A.T. (1944). — Digestion in the Ruminant. *Biol. Rev., 17,* 18-31.
118. Mc Clymont G.L. (1951 a). — Identification of the volatile fatty acids in the peripheral blood and rumen of cattle and the blood of other species. *Austr. J. Agric. Res., 2,* 92-103.
119. Mc Clymont G.L. (1951 b). — Volatile fatty acids metabolism of Ruminants with particular reference to the lactating bovine mammary gland and the composition of milk fat. *Austr. J. Agric. Res., 2,* 158-181.
120. Mc Donald I.W. (1952). — The role of ammonia in ruminal digestion of protein. *Biochem. J., 51,* 86-90.
121. Mc Dougall E.I. (1948). — Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J., 43,* 99-109.
122. Mc Kay E.S.M. and Oxford A.E. (1954). — Some facultatively anaerobic gram negative rods from the rumen of the calf and the sheep. *J. Gen. Microbiol., 11,* 472-478.
123. Mc Naught M.L. (1951). — The utilization of non-protein nitrogen in the Bovine rumen. 7. A qualitative and quantitative study of the breakdown of carbohydrate which accompanies protein formation in bovine rumen contents during *in vitro* incubation. *Biochem. J., 49,* 325-332.
124. Mc Naught M.L., Owen E.C., Henry K.M. and Kon S.K. (1954). — The utilization of non-protein nitrogen in the Bovine rumen. 8. The nutritive value of the proteins of preparations of dried rumen bacteria, rumen protozoa and Brewer's yeast for rats. *Biochem. J., 56,* 151-156.
125. Mc Neill J.J. and Jacobson D.R. (1955). — Studies on the methane and hydrogen metabolism of bovine rumen bacteria. *Maryland Agr. Exptl. Sta.,* Misc. Publ., *238,* 7-8.
126. Mc Quillen K., Roberts R.B. and Britten R.J. (1959). — *Proc. Natl. Ac. Sci.* V.S., *45,* 1437, *in* Gunsalus and Stanier.
127. Mandelstam J. (1958). — The free amino-acids in growing and non-growing populations of *E. coli. Biochem. J., 69,* 103-110.

128. Marshall R.A. and Phillipson A.T. (1945). — The production and absorption of the volatile acids in the rumen. *Proceed. Nutr. Soc., 3,* 238-243.
129. Marston H.R. (1948). — The fermentation of cellulose *in vitro* by organisms from the rumen of the sheep. *Biochem. J., 42,* 564-574.
130. Mitchell H.K., Nyc J.F. and Owen R.D. (1948). — Utilization by the rat of 3-Hydroxyanthranilic acid as a substitute for nicotinamide. *J. Biol. Chem., 175,* 433-438.
131. Mitoma C., Weissbach H. and Udenfriend S. (1955). — Formation of 5-Hydroxytryptophan from tryptophan by *Chromobacterium violaceum. Nature, 175,* 994-995.
132. Monroe C.F. and Perkins A.E. (1939). — A study of the pH values of the ingesta of the bovine rumen. *J. Dairy Sci., 22,* 983-991.
133. Mylroie R.L. and Hungate R.E. (1954). — Experiments on the methane bacteria in sludge. *Can. J. Microbiol., 1,* 55-64.
134. Nasr H. (1950). — Amylolytic activity in the rumen of the sheep. *J. Agr. Sci., 40,* 308-310.
135. Nisman B. (1954). — The Stickland reaction. *Bacteriol. Rev., 18,* 16-42.
136. Nisman B., Raynaud M. et Cohen G.N. (1948). — Etude de la réaction de Stickland. *Ann. Inst. Pasteur, 74,* 323-327.
137. Nisman B., Raynaud M. et Cohen G.N. (1948). — Extension of the Stickland reaction to several bacterial species. The following facultative anaerobes do not carry out a Stickland reaction : *Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli. Arch. Biochem., 16,* 473.
138. Nisman B. et Vinet G.C.R. (1949 a). — Le catabolisme oxydatif des acides aminés chez les bactéries anaérobies strictes. *Ann. Inst. Pasteur, 77,* 277-301.
139. Nisman B. et Vinet G.C.R. (1949 b). — L'arsinite de Na, inhibiteur spécifique des amino-acides réductases des bactéries anaérobies strictes. *C.R. Acad. Sci., 229,* 675-676.
140. Nordmann R., Gauchery G., du Ruisseau J.P., Thomas Y. et Nordmann J. (1954). — Chromatographie sur papier des acides organiques non volatils des liquides biologiques. I. L'urine. Technique chromatographique. *Bull. Soc. Chim. Biol., 36,* 1461-1471.
141. Nordmann R., Gauchery G., du Ruisseau J.P., Thomas Y. et Nordmann J. (1954). — Chromatographie sur papier des acides organiques non volatils des liquides biologiques. II. Le chromatogramme qualitatif de l'urine humaine normale. *Bull. Soc. Chim. Biol., 36,* 1641-1654.
142. Nuvole P. (1961). — Valori della tansione superficiale nel contenuto del rumine dei bovini e degli ovini. *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper., 37,* 1128-1130.
143. Osteux R. et Laturaze J. (1954). — Chromatographie sur

papier des acides organiques fixes de l'urine. *C.R. Acad. Sci., 239,* 512-513.
144. Osteux R. et Laturaze J. (1955). — Identification par chromatographie sur papier des acides organiques fixes de l'urine. *Bull. Soc. Pharm. Lille, 1,* 67.
145. Partridge S.M. (1946). — Application of the paper partition chromatography to the qualitative analysis of reducing sugars. *Nature, 158,* 270-271.
146. Pasieka A.E. and Morgan J.F. (1956). — Quantitative determination of phenylalanine on paper chromatograms. *Anal. Chem., 28,* 1964-1966.
147. Pearson R.M. and Smith J.A.B. (1943). — Methods of analysis of the rumen ingesta and preliminary experiments *in vivo. Biochem. J., 37,* 142-152.
148. Phares E.F., Delwiche E.A. and Carson E.F. (1956). — Succinic acid decarboxylation system in *Propionibacterium pentosaceum* and *Veillonella gazogenes.* I. Activation decarboxylation and related reactions. II. Evidence for an active « C_1 » complex. *J. Bacteriol., 71,* 598-610.
149. Phillips J.D. and Pollard A. (1953). — Degradation of sugars on ion exchange columns of Amberlite IRA 400 (OH'). *Nature, 171,* 41-42.
150. Phillipson A.T. (1942). — The fluctuation of pH and organic acids in the rumen of sheep. *J. Exptl. Biol., 19,* 186-198.
151. Phillipson A.T. (1947). — Fermentation in the alimentary tract and the metabolism of the derived fatty acids. *Nutr. Abst. Revs., 17,* 12-18.
152. Phillipson A.T. (1952). — The fatty acids present in the rumen of Lambs fed on a flaked maïze ration. *British J. Nutr., 6,* 190-198.
153. Phillipson A.T. and Cuthbertson D.P. (1956). — Proceedings of VII th Internat. Congress Anim. Husbandry Madrid.
154. Phillipson A.T. and Mc Anally R.A. (1942). — Studies on the fate of carbohydrate in the rumen of the sheep. *J. Exptl. Biol., 19,* 199-214.
155. Pickett M.J. (1941). — Studies on the metabolism of *Clostridium tetani. J. Biol. Chem., 151,* 203-209.
156. Prescott J.N., Williams W.I. and Ragland (1959). — Influence of nitrogen source on growth of *Streptococcus bovis. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 102,* 490-493.
157. Prevot A.R. — Techniques pour le diagnostic des bactéries anaérobies. Coll. « Techniques de Bases », Ed. de la Tourelle, 15, rue Guynemer, Saint-Mandé (Seine).
158. Prevot A.R. et Saissac R. (1947). — Recherches sur la production des phénols par les bactéries anaérobies. *Ann. Inst. Pasteur, 73,* 1125-1129.
159. Pringsheim H. (1912). — Uber den Fermentation Abbau der Cellulose. *Hoppe Seyl. Z., 78,* 266-291.
160. Pucher G.W., Wakeman A.J. and Vickery H.B. (1941). - *Industr. Eng. Chem. Anal. Edit., 13,* 244, d'après Peach K.

and Tracey M.V. Modern methods of plant analysis, vol. II, p. 485.
161. Quin J.I. and van der Wath J.G. (1939). — Studies on the alimentary tract of Merino sheep in south Africa. V. The motility of the rumen under various conditions. *Onderstepoort J. Vet. Sci., 11,* 361-370.
162. Rabinowitz J.C. and Pricer W.E. (1956). — *J. Am. Chem. Soc., 78,* 5702, *in* Gunsalus and Stanier.
163. Raynaud P. (1959). — Recherches sur le métabolisme de l'azote dans les réservoirs gastriques des Ruminants. *Thèse,* Fac. Sciences, Toulouse.
164. Réaumur R.A.F. (1752). — Mémoire de l'Académie des Sciences, d'après Spallanzani.
165. Reid R.L. (1950 a). — Studies on the carbohydrate metabolism of sheep. I. The range of blood sugar values under several conditions. *Austr. J. Agric. Res., 1,* 182-199.
166. Reid R.L. (1950 b). — Studies on the carbohydrate metabolism of sheep. II. The uptake by the tissues of glucose and acetic acid from the peripheral circulation. *Austr. J. Agric. Res., 1,* 338-354.
167. Reid R.L. (1950 c). — Utilization of acetic and propionic acids in sheep. *Nature, 165,* 448.
168. Reineke E.P., Stonecipher W.D. and Turner C.W. (1941). — The relation between the fat and carbohydrate metabolism of lactation as indicated by the quotient of the mammary gland. *Amer. J. Physiol., 132,* 535.
169. Reiser R. (1951). — Fed. Proc., *10,* 236, *in* Annison and Lewis.
170. Rhein M.C.R. (1921). — Sur la production du phénol par le Bacille tétanique et le Bacille pseudo-tétanique. *C.R. Soc. Biol., 84,* 561-563.
171. Rodwell A.W. (1953). — The occurence and distribution of amino-acid decarboxylases within the genus *Lactobacillus. J. Gen. Microbiol., 8,* 222.
172. Rosenberg A.J. et Nisman B. (1949). — Sur l'action alpha-amino-acide oxydasique de *Cl. sporogenes* et de *Cl. saccharobutyricum* en présence d'oxygène. *Biochim. and Biophys. Acta, 3,* 348-357.
173. Samuelson O. (1952). — Ion exchangers in analytical chemistry. Almquist and Wiksell, Stockholm, *in* Laturaze.
174. Schambye P. (1951). — Volatile acids and glucose in portal blood of sheep. II. Sheep fed hay and hay plus crusted oats. *Nord. Vet. Med., 3,* 555-574 et 748-752.
175. Schambye P. (1955). — Experimental estimation of the portal vein blood in sheep. I. Examination of an infusion method and results from acute experiments. II. Chronic experiments in cannulated sheep applying infusion and injection methods. *Nord. Vet. Med., 7,* 961-975 et 1001-1035.
176. Schambye P. and Phillipson A.T. (1949). — Volatile fatty acids in portal blood of sheep. *Nature, 164,* 1094-1095.

177. Schultz L.H. and Smith V.R. (1951). — Experimental alteration of the sugar and ketone levels of the blood of ruminants in relation to ketosis. *J. Dairy Sci., 34,* 1191-1199.
178. Scott T.A. and Happold F.C. (1952). — Studies on the inhibition of induced tryptophanase synthesis *in E. coli* by the simultaneous presence of fermentable carbohydrate and aromatic amino-acids during growth. *Biochem. J., 82,* 407-412.
179. Scott T.W., Ward P.F.V. and Dawson R.M.C. (1963). — Formation of aromatic fatty acids from amino-acids by rumen microorganisms. *Biochem. J., 87,* 3P-4P.
180. Scriban R. (1951). — Les protides de l'orge, du malt et du moût. *Thèse Sciences Nat.,* Lille.
181. Seligson D. and Seligson H. (1951). — A microdiffusion method for the determination of nitrogen liberated as ammonia. *J. Lab. Clin. Med., 38,* 324-330.
182. Sheppard A.J., Forbes R.H. and Johnson B.C. (1959). — Rate of acetic acid production in the rumen determined by isotope dilution. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 101,* 715-717.
183. Shilo M. (1957). — The enzymic conversion of the tartaric acids to oxaloacetic acid. *J. Gen. Microbiol., 16,* 472-481.
184. Shinozaki K. (1957). — Studies on experimental bloat in Ruminants. 4. Identification of amines from rumen ingesta and passage of histamine across the rumen epithelium. Tohoku, *J. Agr. Res., 8,* 149-155.
185. Shorland F.B., Weenink R.O. and Johns A.T. (1955). — Effect of the rumen on dietary fat. *Nature, 175,* 1129-1130.
186. Sijpesteijn A.K. (1951). — *J. Gen. Microbiol., 5,* 869 *in* Jarrige.
187. Sijpesteijn A.K. and Elsden S.R. (1952). — The metabolism of succinic acid in the rumen of the sheep. *Biochem. J., 52,* 41-45.
188. Sirotnak F.M., Doetsch R.N., Brown R.E. and Shaw J.C. (1953). — Amino-acid degradation by mixed suspensions of bovine rumen bacteria. *J. Dairy Sci., 36,* 1117-1123.
189. Sirotnak F.M., Doetsch R.N., Robinson R.G. and Shaw J.C. (1954). — Aspartate dissimilation reactions of rumen bacteria. *J. Dairy. Sci., 37,* 531-537.
190. Smith V.R. (1941). — *In vivo* studies of hydrogen ion concentrations in the rumen of dairy cow. *J. Dairy Sci., 24,* 124.
191. Smith P.H. and Hungate R.E. (1958). — Isolation and characterization of *Methanobacterium ruminantium,* n.sp. *J. Bacteriol., 75,* 713-718.
192. Spallanzani L. (1783). — Expériences sur la digestion de l'Homme et des différentes espèces animales. Chirol (B.) Libr. Genève.
193. Spisni D. e Cappa V. (1954). — Presenza di indolo nel contenuto del rumine di bovini. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 30,* 1418-1419.

194. Stadtman E.R. (1955). — Fermentations de l'acide propionique. *Bull. Soc. Chim. Biol., 37,* 931-938.
195. Stark J.B., Goodban A.E. and Owens H.S. (1951). — *Anal. Chem., 23,* 413 *in* Lederer E. and Lederer M. (Second Ed., 1957).
196. Stevens E. (1777). — Cité par Thomas Thomson, « Animal chemistry » Edinburgh (1843), 593 *in* Barnett and Reid.
197. Stickland L.H. (1934). — Studies in the metabolism of the strict anaerobes (*genus Clostridium*) I. The chemical reactions by which *Cl. Sporogenes* obtains its energy. *Biochem. J., 28,* 1746-1759.
198. Stickland L.H. (1934). — Studies in the metabolism of the strict anaerobes (*genus Clostridium*). III. The oxidation of alanine by *Cl. sporogenes.* IV. The reduction of glycine by *Cl. sporogenes. Biochem. J., 29,* 889-898.
199. Stowe B.B. and Thimann K.V. (1953). — Indolepyruvic acid in maïze. *Nature, 172,* 764.
200. Tappeiner H. (1883). — Die Gase des Verdauungsschlauches der Pflanzenfresser. *Z. Biol., 19,* 228-279.
201. Tappeiner H. (1884). — Untersuchungen über die Garung der Cellulose insbesondere über deren Lösung in Darmkanale. *Z. Biol., 20,* 52-134.
202. Terroine E.F. et Ritter Ch. (1927). — Le métabolisme de base est-il une fonction de la masse active représentée par les substances nucléiques ? *Ann. Physiol. et Physicochim. Biol., 4,* 575-587.
203. Terroine E.F. et Szucs F. (1930). — Le rapport des corps puriques aux protides chez les microorganismes. *Ann. Physiol. et Physicochim. Biol., 6,* 129-149.
204. Thibault P. et Le Minor L. (1957). — Méthodes simples de recherche de la lysine décarboxylase et de la tryptophane désaminase à l'aide des milieux pour différenciation rapide des Enterobactériacées. *Ann. Inst. Pasteur., 92,* 551-554.
205. Tiedemann F. et Gmelin L. (1826). — Recherches expérimentales physiologiques et chimiques sur la digestion. Baillere J.B. Edit. Paris.
206. Tsuda T. (1956). — Studies on the absorption from the rumen. II. Absorption of several organic substances from the miniature rumen of the goat. Tohuku, *J. Agr. Res., 7,* 241.
207. Van Niel. — *In* Gunsalus and Stanier, vol. II. p. 136.
208. Van Der Hande C., Oyaert W. and Bouikaert T. (1959). — Dissimilation of aspartic acid by rumen bacteria. *Zentralblatt für Veterinarmedizin., 6,* 681.
209. Waldo D.R. and Shultz L.H. (1956). — Lactic acid production in the rumen. *J. Dairy Sci., 39,* 1453-1460.
210. Warner A.C.I. (1956). — Proteolysis by rumen microorganisms. *J. Gen. Microbiol., 14,* 749-762.
211. Watts P.S. (1957). — Decomposition of oxalic acid *in vitro* by rumen contents. *J. Agric. Res., 8,* 266-270.

212. Wegner G.H. and Foster E.M. (1960). — Fatty acid requirements of certain rumen bacteria. *J. Dairy Sci., 43,* 566-568.
213. Weinhouse S. and Friedmann B. — *J. Biol. Chem., 191,* 707, *in* Bastie.
214. Weller R.A. (1957). — The amino-acid composition of hydrolysates of microbial preparations from the rumen of sheep. *Austr. J. Biol. Sci., 10,* 384-389.
215. White E.P. (1944). — *New Zealand J. Sci. Technol. B., 25,* 137, *in* Meister.
216. Whiteley H.R. (1957). — Fermentation of amino acids by *Micrococcus aerogenes. J. Bacteriol., 74,* 324-330.
217. Wilsing H. (1885). — Ueber die Mengen der vom Wiederkaner in den Entleerungen ausgeschiedenen. *Z. Biol., 21,* 625-630.
218. Wolin M.J., Manning G.B. and Nelson W.O. (1959). — Ammonium salts as a sole source of nitrogen for the growth of *Streptococcus bovis. J. Bacteriol., 78,* 147-149.
219. Wood W.A., Gunsalus I.C. and Umbreit W.W. (1947). — Function of pyridoxal phosphate : resolution and purification of the tryptophanase enzyme of *E. coli. J. Biol. Chem., 170,* 313-321.
220. Woodman H.E. and Evans R.E. (1938). — The mechanism of cellulose digestion in the Ruminant organism. IV. Further observations from *in vitro* studies of the behaviour of rumen bacteria and their bearing on the problem of the nutritive value of cellulose. *J. Agric. Sci., 28,* 43-63.
221. Woodman H.E. and Stewart J. (1928). — The mechanism of cellulose digestion in the Ruminant organism. II. The transformation of cellulose into glucose by the agency of cellulose splitting bacteria. *J. Agric. Sci., 18,* 713-723.
222. Woods D.D. (1935). — Indole formation by *Bacterium coli* I. The breakdown of tryptophan by washed suspensions of *Bacterium coli. Biochem. J., 29,* 640-649.
223. Woods D.D. and Clifton C.E. (1937). — Studies in the metabolism of strict anaerobes (*genus Clostridium*). V. Hydrogen production and amino-acid utilization by *Clostridium tetanomorphum. Biochem. J., 31,* 1774-1788.
224. Woolf B. (1929). — Some enzymes in *B. coli* which act on fumaric acid. *Biochem. J., 23,* 472-482.